

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลกระทบของแสงต่อการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในพืชตัดแปลงพันธุกรรม



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 83991
วัน,เดือน,ปี... 23 ก.ย. 2551

b. 11๑ ๖๘๖๗
i.

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of The Lights on Flavonoid Accumulation in Transgenic Plants



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science Biotechnology Program

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง ผลกระทบของแสงต่อการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในพืชตัดแปลงพันธุกรรม

นักศึกษา ปวีณา พุ่มพฤษย์ รหัสนักศึกษา 47050139
 อรทัย ภักดี รหัสนักศึกษา 47050173

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพฑิณ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพฑิณ	

.....
 (รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง)
 หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ผลกระทบของแสงต่อการสะสมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในพืชตัดแปลงพันธุกรรม	
นักศึกษา	ปวีณา พุ่มพฤษย์	รหัสนักศึกษา 47050139
	อรทัย ภักดี	รหัสนักศึกษา 47050173
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพลิน	

บทคัดย่อ

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารทุติยภูมิที่มีการชักนำตอบสนองต่อปัจจัยหลายชนิดรวมทั้งแสง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนและถ่ายโอนยีน *TT8* ซึ่งเป็นยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์จาก *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ต้นยาสูบ นำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8* มาเลี้ยงในสภาพความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน (500 และ 800 ลักซ์) หรือแหล่งกำเนิดแสงที่แตกต่างกัน (ฟลูออเรสเซนต์ แบล็คไลท์ และ โกลด์ลักซ์) ที่ความเข้มแสงที่ 500 ลักซ์ โดยเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่างๆในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (*CHS* (chalcone synthase), *F3'H* (flavonoid 3'-hydroxylase) และ *PAP2*) ทำการวิเคราะห์การตอบสนองทางสรีรวิทยาและเมตาบอลิซึมของต้นยาสูบปกติและยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ ไม่มีผลให้พืชเกิดความเครียด สังเกตได้จากปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์) และปริมาณสารมาลอนไดไฮดริค (ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน) แต่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการสะสมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟลาโวน และฟลาโวนอลในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *F3'H* และ *TT8* ในขณะที่การสะสมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบสายพันธุ์อื่นๆไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม แหล่งของแสงที่แตกต่างกันโดยที่ความเข้มแสงเท่ากัน แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองทางสรีรวิทยาและเมตาบอลิซึมอย่างชัดเจนในต้นพืชทดลองทุกสายพันธุ์ รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบในสภาวะแสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ เมื่อเทียบกับสภาวะแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นที่น่าสนใจว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ให้ปริมาณมาลอนไดไฮดริคสูงสุด ในขณะที่แสงสีแดงจากหลอดโกลด์ลักซ์เกิดมาลอนไดไฮดริคต่ำสุด แสงจากหลอดแบล็คไลท์ส่งเสริมให้เกิดการสะสมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์บริเวณที่ต้นวิถี โดยเฉพาะต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *F3'H* และ *TT8* ในขณะที่แสงจากหลอดโกลดักซ์และฟลูออเรสเซนต์
ไม่แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณการสะสมสารกลุ่มนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of The Lights on Flavonoid Accumulation in Transgenic Plants
Name	Paweena Phumphruks Orathai Pakdee
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

Abstract

Flavonoids are the plant secondary metabolites induced response to various factors including light. In this study, *transparent testa 8 (TT8)*, regulatory gene involved in flavonoid biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*, has been cloned and transformed into tobacco. The transgenic tobacco containing regulatory *TT8* gene were treated with different intensity of fluorescence light (500 and 800 lux) and in the different light sources (fluorescence, black light and gold lux) at 500 lux intensity in comparing with wild type and tobaccos transformed with the other genes from flavonoid biosynthesis (*CHS* (chalcone synthase), *F3'H* (flavonoid 3'-hydroxylase) and *PAP2*). The physiological and metabolic responses of wild type and transgenic tobaccos were analyzed. The fluorescence light at 800 lux intensity did not affect on plant stress when the response observed from photosynthetic contents (chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid) and malondialdehyde (the end-product of lipid peroxidation). The fluorescence light at 800 lux intensity leads to induce the highest accumulation of flavanone, flavone and flavonol in *F3'H* transgenic tobacco following with *TT8* transgenic tobacco. While the flavonoid accumulation in wild type and the other transgenic plants were not difference among control and treatment. The different light sources at the same light intensity show the distinction of physiological and metabolic responses in all plants. Comparing with fluorescence condition, all photosynthetic pigments of tobaccos significantly decreased under black light condition and red light of gold lux respectively. Surprisingly, malondialdehyde level was the highest in tobacco under fluorescence condition, while in tobacco under gold lux condition was the lowest. Black

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

light treatment extremely enhanced accumulation of flavonoids from early biosynthetic pathway especially in *F3'H* and *TT8* transgenic tobacco. Red light and fluorescence light treatments did not show much differences of flavonoid accumulation.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ของคณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยโครงการสามารถ ประสบความสำเร็จได้ เนื่องมาจากความอนุเคราะห์ของ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพสิน ผู้เป็นอาจารย์ ที่ปรึกษา จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ และให้คำปรึกษา ตลอดจนการดำเนินงานโครงการพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.มาลินี ดันตยาภรณ์ และรศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่เสียสละเวลามาเป็น ประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ท็อป พี่ที พี่ผึ้ง พี่ตัวเขียว พี่เบิ้ล และเพื่อนๆทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทุกอย่างจน โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ปวีณา พุ่มพฤษ์
อรทัย ภัคดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญที่มาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เฟลไวโนยด์	4
2.2 ชีวิตสังเคราะห์ของเฟลไวโนยด์	9
2.3 การควบคุมชีวิตสังเคราะห์เฟลไวโนยด์	10
2.4 ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวิตสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิดอปซิส	12
2.5 การโคลนยีน	13
2.6 การถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย	16
2.7 ปฏิกริยาลูกลูโซโพลีเมอร์เรส	18
2.8 การสกัดแอนโทไซยานิน	18
2.9 คลอโรฟิลล์	19
2.10 พลังงานแสง	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 อุปกรณ์	23
3.2 วิธีการทดลอง	24
3.2.1 การโคลนยีน	24
3.2.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	27
3.2.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้ อะโกรแบคทีเรีย	27
3.2.4 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของพืชทดลอง	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	30
4.1 การโคลนยีน	30
4.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ T78	30
4.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pBI 121 และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ <i>E. coli</i>	31
4.1.3 การตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ ในพลาสมิด pBI 121	32
4.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	35
4.2.1 การตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	35
4.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย	36
4.3.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน	36
4.3.2 กัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน	37
4.4 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง	39
4.4.1 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง	39
4.4.2 ผลของชนิดแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	66
5.1 การโคลนยีน	66
5.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	66
5.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย	66
5.4 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง	67
5.4.1 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง	67
5.4.2 ผลของชนิดแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง	67
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	71
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง	74



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงยื่นควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชต่างๆ	13
2.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ	14



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างหลักของเฟลโวนอยด์	4
2.2 โครงสร้างทางเคมีของ แกแเรนดิน เคเอ็มพีรอล เคอร์เซติน และไมริเซติน	5
2.3 โครงสร้างทางเคมีของอาร์โทรฟิน และ มัลเบริน	6
2.4 การเปลี่ยนแปลงจากแซลโคนเป็นไอโอฟลโวน	7
2.5 การเปลี่ยนแปลงจากไอโอฟลโวนเป็นไอโอฟลโวนอยด์ชนิดอื่น ๆ	7
2.6 วิธีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์	10
2.7 โครงสร้างจำลองของโปรตีนในกลุ่ม bHLH และกลุ่ม WD40	11
3.1 แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>TT8</i> และ พลาสมิด pBI121	26
4.1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกชิ้นดีเอ็นเอจาก pGEM และทำให้บริสุทธิ์	30
4.2 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนี <i>E. coli</i> ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน	31
4.3 พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	32
4.4 แสดงจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bg</i> III และ <i>Hind</i> III บนเวกเตอร์ pBI121 และดีเอ็นเอ <i>TT8</i>	34
4.5 แสดงพลาสมิดจากโคลนหมายเลข 8 และเวกเตอร์ pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bg</i> III และ <i>Hind</i> III	35
4.6 ผลของการพีซีอาร์พลาสมิดจากโคลนหมายเลข 4 โดยใช้ไพรเมอร์ 35S	36
4.7 ยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายโอนยีน <i>TT8</i>	37
4.8 ผลจากการทำพีซีอาร์ของสารสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบ	38
4.9 ต้นยาสูบทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	39

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 ปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสงในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	40
4.11 ปริมาณของเอ็มดีเอในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	42
4.12 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรดินในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	43
4.13 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	44
4.14 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวาโนนในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	46
4.15 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอล ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.16 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	49
4.17 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลูโคไซด์แทนนินในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	51
4.18 ต้นยาสูบทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนซ์หลอดแบล็คไลท์ และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	52
4.19 ปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสงในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	53
4.20 ปริมาณของเอมตีเอในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	55
4.21 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรตินในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.22 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวโนนในสารสกัดจาก ต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน ชีวสังเคราะห์เฟลวโนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยง ภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ไลท์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	57
4.23 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวาโนนในสารสกัดจาก ต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน ชีวสังเคราะห์เฟลวโนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยง ภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ไลท์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	59
4.24 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวโนอลในสารสกัดจาก ต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน ชีวสังเคราะห์เฟลวโนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยง ภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ไลท์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	60
4.25 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทโรไซยานินในสารสกัดจาก ต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน ชีวสังเคราะห์เฟลวโนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยง ภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ไลท์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน	62
4.26 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลอสแทนนินในสารสกัดจาก ต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน ชีวสังเคราะห์เฟลวโนอยด์ (<i>CHS</i> , <i>F3'H</i> , <i>PAP2</i> และ <i>TT8</i>) ที่เพาะเลี้ยง ภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ไลท์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์เป็นเวลา 7 วัน	64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ

ฟเลโวนอยด์ (flavonoids) เป็นกลุ่มสารที่ให้สีส้มแก่พืช รวมถึงสีส้มสวยงามของกลีบดอกไม้ สารกลุ่มนี้สามารถดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet:UV) ได้ดีและเปล่งออกมาเป็นแสงสีต่าง ๆ ของดอกไม้ สารกลุ่มนี้จะพบได้เฉพาะในพืชที่อยู่บนดินหรือพืชที่อยู่เหนือน้ำ แต่จะไม่พบในพืชที่อยู่ในทะเลลึก เช่น marine algae ซึ่งเชื่อว่าการวิวัฒนาการขึ้นมาบนบก พืชได้พัฒนากระบวนการสร้างฟเลโวนอยด์ขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ฟเลโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมหรือเมื่อได้รับความเครียด เช่น ความเย็น ความเค็ม ความแห้งแล้ง และรังสี เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า รังสี UV-B มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารกลุ่มนี้เมื่อทดลองในแคลลัสของต้น *Passiflora quadrangularis* (Pagnucco และคณะ, 2006) นอกจากนี้ฟเลโวนอยด์ยังมีความสำคัญกับมนุษย์ เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถบำบัดโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ แผลในกระเพาะอาหาร มะเร็ง และตับติดเชื้อ เป็นต้น (Gallego และคณะ, 2007)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของฟเลโวนอยด์แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยีนโครงสร้าง (structural gene) ที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสและแปลรหัสให้เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในชีวสังเคราะห์ และยีนควบคุม (regulatory gene) จะให้โปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง (กนกพร, 2545) ยีน transparent *TESTA 8 (TT8)* เป็นยีนควบคุมตัวหนึ่งที่ควบคุมการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้เป็นยีนในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) ซึ่งจำเป็นต่อการแสดงออกของยีนโครงสร้างของฟเลโวนอยด์หลายๆยีน (Caboche และคณะ, 2000) โดยยีน *TT8* จะทำงานร่วมกับยีนโครงสร้างตัวอื่นๆ คือ *TTg1* และ *TT2* ในการควบคุมการทำงานของยีน *BANYULS (BAN)* และ ยีน *DFR* ในการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่มฟเลโวนอยด์ที่ปลายวิถี โดยยีน *BAN* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) (Caboche และคณะ, 2001)

ในโครงการพิเศษนี้ทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มและชนิดแสงที่มีต่อการแสดงออกของพืชทดลองที่มียีนควบคุมและยีนโครงสร้างจากชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ เปรียบเทียบกับต้นพืชปกติ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 สร้างเวกเตอร์ที่มียีนควบคุม *TT8* สำหรับแสดงออกในพืชทดลอง
- 1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เข้าสู่พืชทดลอง
- 1.2.3 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์และการตอบสนองทางสรีรวิทยาในต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT8* และยีนอื่นๆในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H* และ *PAP2*)

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8* เข้าสู่ต้นพืชทดลองและศึกษาผลของแสงที่มีต่อการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ และการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นพืช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตัดต่อยีนควบคุม *TT8* เข้าสู่เวกเตอร์ pBI121
2. สามารถถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8* เข้าสู่ต้นพืชทดลองโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*
3. สามารถคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8*
4. เปรียบเทียบผลของแสงที่มีต่อการผลิตสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ระหว่างพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT8*, *CHS*, *F3'H* และ *PAP2*
5. ปริมาณการสะสมสารเฟลโวนอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นพืชที่ได้รับยีนแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับต้นควบคุม

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR
2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ *TT8* กับ *Agrobacterium* expression vector (vector pBI121)
 - 2.1 เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector
 - 2.2 ถ่ายโอน *Agrobacterium* expression vector เข้าสู่ *E. coli* เพื่อคัดลอกและเพิ่มปริมาณ พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่
 - 2.3 คัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง (sense)
3. ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Agrobacterium*
 - 3.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2 ทำการถ่ายโอนยีนที่ต้องการเข้าสู่ *Agrobacterium*
4. ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลองโดยใช้ *Agrobacterium*
- 4.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ที่ต้องการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลอง ในอาหารเหลว
- 4.2 นำพืชทดลองมาศึกษาเทคนิคการถ่ายโอนยีนโดยใช้ *Agrobacterium*
- 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีน
5. การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน
6. นำต้นพืชที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนมาเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้ม 500 และ 800 ลักซ์ และแสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์
7. สกัดสารกลุ่มฟเลโวนอยด์และเม็คลีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในแต่ละวิธีการทดลอง
8. หาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและปริมาณสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ต่อการต้านทานต่อความเข้มและชนิดของแสง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

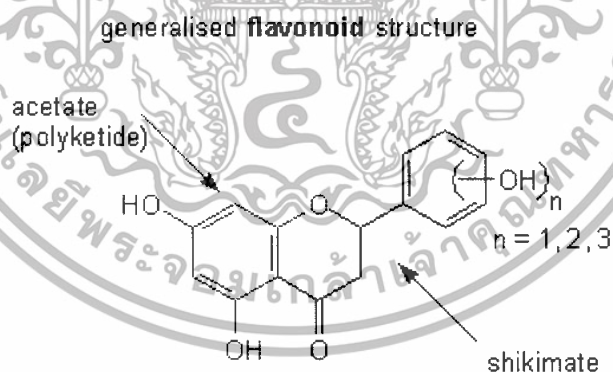
บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 เฟลโวนอยด์ (flavonoids)

เฟลโวนอยด์เป็นกลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีส้มต่างๆในพืช แบ่งตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มมีสารชนิดอื่นๆอีกมากมาย จากการศึกษาที่ผ่านๆ มาทำให้ทราบถึงบทบาทของเฟลโวนอยด์ในพืชต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงมนุษย์และสัตว์ เช่น การปกป้องต้นพืชจากแสงยูวี การล่อแมลงและนกเพื่อใหช่วยในการแพร่พันธุ์ นอกจากนี้เฟลโวนอยด์ยังมีความสำคัญทางด้านการแพทย์ต่อมนุษย์ โดยมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มการไหลเวียนของโลหิต

โครงสร้างหลักของเฟลโวนอยด์ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงตัวเป็น 3 วง เรียกว่า วง A B และ C โดย วง A และ B เป็นวงฟีนิล (phenyl ring) ส่วน วง C เป็นวงแลคโตน (lactone ring) ดังรูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่วง C ทำให้มีการแยกเฟลโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มย่อยได้ต่างๆ กัน และการเกิดไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ที่ วง A และ B ทำให้เกิดอนุพันธ์ของเฟลโวนอยด์ชนิดนั้นๆ



รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักของเฟลโวนอยด์

ที่มา: <http://mylesson.swu.ac.th/ppg301/meta/12Mixed.htm>

สารประกอบเฟลโวนอยด์มีอยู่มากมายในธรรมชาติ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฟลโวนอยด์บางกลุ่ม พร้อมทั้งตัวอย่างของอนุพันธ์ที่สำคัญ

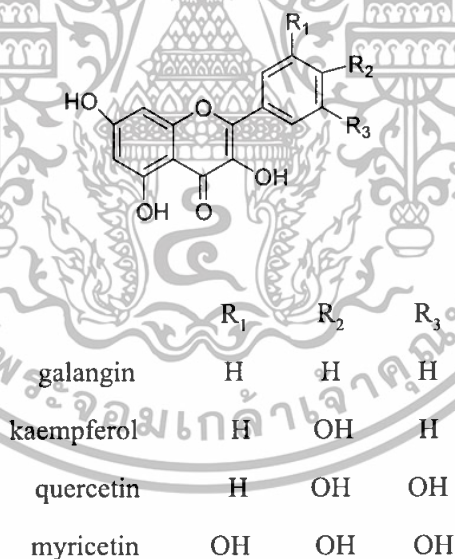
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 แซลโคน (chalcone) และออโรน (aurone)

สารนี้มีโครงสร้างที่วง C แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อถูกแอมโมเนียจะเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีแดง จึงเรียกลักษณะนี้ว่า แอนโทเชลอร์ (antochlo) แซลโคนให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกไม้ในวงศ์ Compositae Oxalidaceae Scrophulariaceae Liliaceae และ Acanthaceae เป็นต้น ส่วนสารออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น ซัลฟูเรทิน (sulfuretin) ในดอกกรักร์ (*Dahlia spp.*) และฮิสพิดอลกลูโคไซด์ (hispidol glucoside) ในถั่วเหลือง (*Glycine spp.*)

2.1.2 เฟลโวนอล (flavanols)

เป็นสารที่ไม่มีสีแต่สามารถดูดกลืนรังสีในช่วงใกล้รังสียูวี ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้นเฟลโวนอลจึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสรจึงมีความสำคัญต่อพืชชั้นต้น ส่วนในพืชล้มลุกนั้นจะพบเฟลโวนอลในปริมาณต่ำ และเฟลโวนอลที่พบมากในพืชชั้นสูงได้แก่ เคเอ็มพีรอล (kaempferol) และ เคอร์เซทิน (quercetin) และที่พบได้บ้างได้แก่ ไมริเซทิน (myricetin) และแกแลนจิน (galangin) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีแสดงไว้ในรูปที่ 2.2



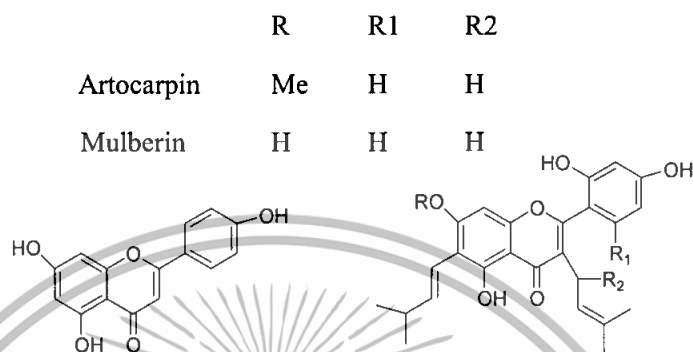
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ แกแลนจิน เคเอ็มพีรอล เคอร์เซทิน และ ไมริเซทิน

ที่มา: <http://mylesson.swu.ac.th/ppg301/meta/12Mixed.htm>

2.1.3 เฟลโวน (flavones)

มักพบเฟลโวนในส่วนของเปลือกต้น แก่น ผล และ ราก ให้สีเหลืองอ่อนถึงแก่ เฟลโวนที่พบในเปลือกต้นของพืชพวกขนุน (*Artocarpus*) และ หม่อน (*Morus*) พืชที่อยู่ในวงศ์เอกลินเป็นเอกลินที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

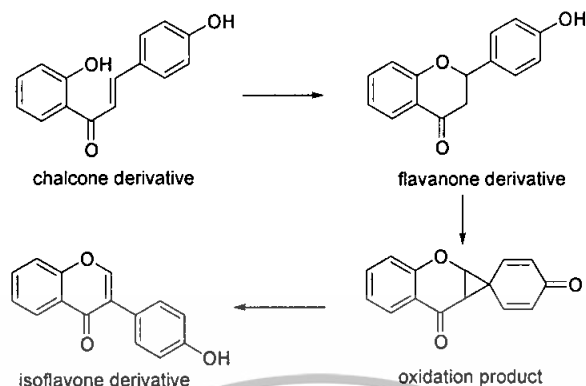
Moraceae จะมีลักษณะเฉพาะคือ มีหมู่ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid unit) ในโมเลกุล โครงสร้างทางเคมีของ อาร์โทคาร์พิน (artocarpin) และ มัลเบอร์ริน (mulberin) แสดงไว้ในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของอาร์โทคาร์พิน และ มัลเบอร์ริน
ที่มา: <http://mylesson.swu.ac.th/ppg301/meta/12Mixed.htm>

2.1.4 ไอโซฟเลโวนอยด์ (isoflavonoids)

เป็นกลุ่มสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อม เช่นเดียวกับสารในกลุ่มฟเลโวนอยด์กระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้แยกจากกลุ่มฟเลโวนอยด์ที่ สารเริ่มต้นแชลโคน (chalcone precursor) กล่าวคือเมื่อแชลโคนเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นฟเลโวนอน แล้วเกิดโยกย้ายวง (ring migration) มีผลให้วง B เปลี่ยนตำแหน่งและได้สารตัวแรกในกลุ่มที่เรียกว่า ไอโซฟเลโวน (isoflavone) (รูปที่ 4) สารไอโซฟเลโวนจะเป็นสารตั้งต้นของไอโซฟเลโวนอยด์อีกหลายชนิดดังรูปที่ 5 ไอโซฟเลโวนอยด์พบมากในพืชตระกูลถั่ว สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซฟเลโวน และ คิวเมสแตน (coumestans)



รูปที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงจากแซลโคเนนเป็นไอโซฟเลโวน

ที่มา: <http://mylesson.swu.ac.th/ppg301/meta/12Mixed.htm>



รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงจากไอโซฟเลโวนเป็นไอโซฟเลโวนชนิดอื่น ๆ

ที่มา: <http://mylesson.swu.ac.th/ppg301/meta/12Mixed.htm>

2.1.5 ไอโซฟเลโวน (isoflavones)

ตัวต่างๆ โดยเฉพาะตัวเหลืองเป็นแหล่งสะสมไอโซฟเลโวน เป็นที่รู้จักกันดีในนามของไฟโตเอสโตเจน (phytoestrogens) ซึ่งหมายถึงกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายเอสโตเจน (estrogen) ประโยชน์ของไฟโตเอสโตเจนคือสามารถป้องกันภาวะเสื่อมต่างๆ ของร่างกายได้ เช่น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก ป้องกันการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุนและปัญหาวัยทอง

ความสามารถในการจับกับเอสโตรเจนิก รีซีฟเตอร์ (estrogenic receptor) ของไอโซเฟลโวนอ่อนกว่าความสามารถของเอสโตรเจน เอสตราไดออล (estrogen estradiol) ถึง 1000 เท่า แต่ที่น่าสนใจคือไอโซเฟลโวนมีทั้งคุณสมบัติเอสโตรเจนิก (estrogenic) และแอนติเอสโตรเจนิก (anti-estrogenic) กล่าวคือ ในกรณีที่ร่างกายขาดเอสโตรเจนสารกลุ่มไอโซเฟลโวนที่มีอยู่ในร่างกายจะทำให้หน้าที่ทดแทนเอสโตรเจนได้ ในกรณีที่ร่างกายมีเอสโตรเจนมากเกินไปไอโซเฟลโวนจะสามารถเข้าไปแย่งจับที่เอสโตรเจนิก รีซีฟเตอร์ เป็นการป้องกันการที่รีซีฟเตอร์ถูกกระตุ้นมากเกินไป ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับมะเร็งได้

2.1.6 คิวเมสแตน (coumestans)

สารในกลุ่มคิวเมสแตน เช่น คิวเมสโตรล (coumestrol) พบได้มากในพืชพวกถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นไฟโคเอสโตรเจนและมีฤทธิ์แรงกว่าไอโซเฟลโวน ถึง 6 เท่า

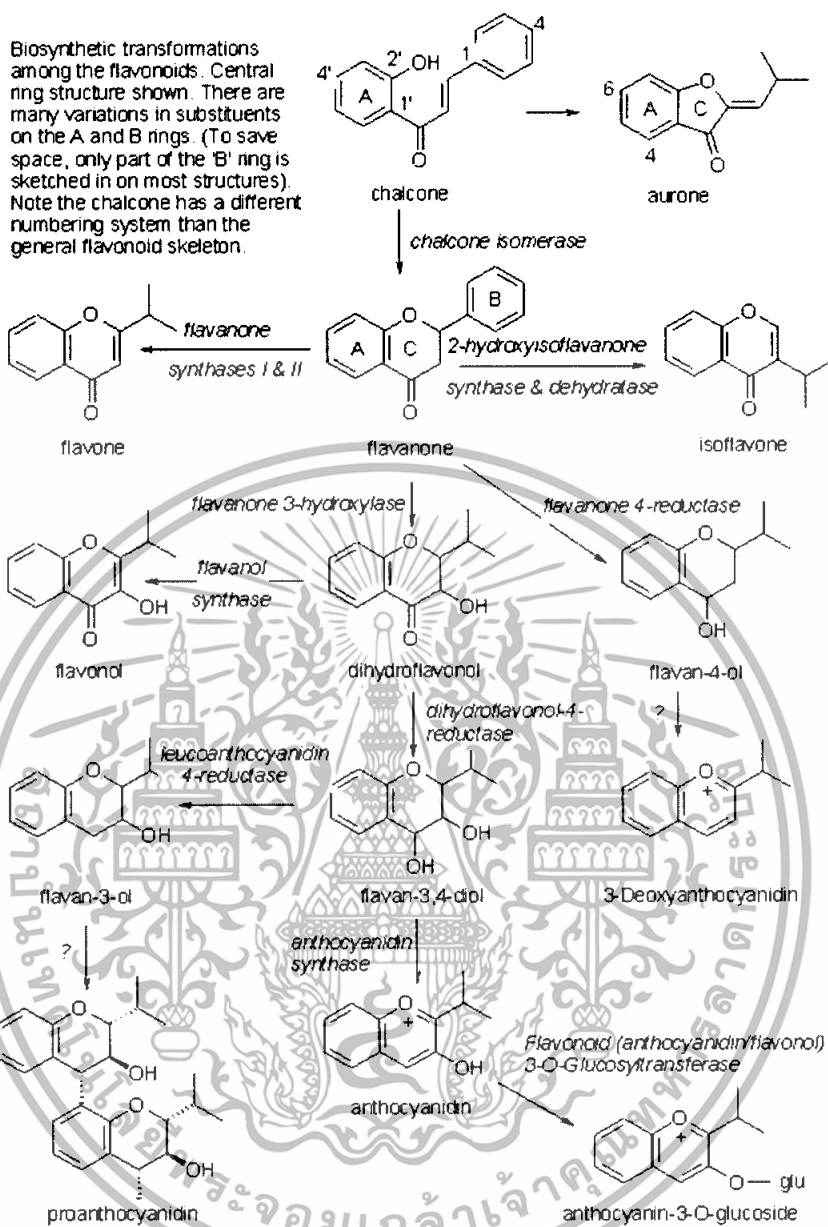
2.1.7 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) (กนกพร, 2545)

แอนโทไซยานินเป็นสารกลุ่มเม็ดสีที่สะสมอยู่ในแวคิวโอลของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืช สารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสงยูวี-บี การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีการรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวน เช่นเดียวกับในข้าวโพด มีการรายงานการสะสมของสารกลุ่มนี้เมื่อถูกหนอนรบกวน และยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับการเพิ่มความต้านทานหนอนรบกวนในพืชอีกด้วย มีการใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวชและเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ลดปริมาณคอเลสเตอรอล และต่อต้านการเกิดมะเร็ง

ชีวสังเคราะห์ของแอนโทไซยานินนั้นให้ผลผลิตเป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย นิยมใช้ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้เป็นต้นแบบสำหรับศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีนและหน้าที่ของยีน โดยเฉพาะการควบคุมการแสดงออกของยีน มีการแยกยีนศึกษาหน้าที่และรูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งได้จากชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในหลายชนิด เช่น อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) พิทูเนีย (*Petunia*) สแนปดรากอน (Snapdragon)

2.2 ชีวสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์ (กนกพร, 2545)

ชีวสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์เริ่มจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของมาโลนิล โคเอ (malonyl CoA) ซึ่งได้รับจากวิถีอะซิเตท-มาโลเนท (acetate-malonate pathway) กับคูมาโลลิต โคเอ (4-coumaroyl-CoA) ซึ่งได้จากวิถีชีวสังเคราะห์ชิคิเมท (shikimate pathway) ด้วยเอนไซม์ chalcone synthase (*CHS*) ได้เป็นแซลโคน (chalcone) มีสีเหลือง ขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแซลโคน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (*CHI*) ให้สารเนรินเจนิน เฟลวาโนน (naringenin flavanone) ไม่มีสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone-3-hydroxylase (*F3H*) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอล คือ สารไดไฮโดรเคเอ็มพีรอล (dihydrokaempferol) สารนี้อาจจะได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) และ flavonoid 3', 5'-hydroxylase (*F3'5'H*) และให้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ไดไฮโดรเคอควีทิน (dihydroquercetin) และไดไฮโดรเมอริซิทิน (dihydromyricetin) ในการเปลี่ยนสารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลเป็นสารที่มีกลุ่มแอนโทไซยานินนั้นต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด เริ่มจากกระตุ้นการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (*DFR*) และสารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิดิน (leucoanthocyanidin) ได้แก่ ลิวโคยานิดิน (leucocyanidin) ลิวโคเพลาโกนิดิน (leucopelargonidin) และ ลิวโคเดลฟินิดิน (leucodelphinidin) ถูกออกซิเดชัน (oxidation) ดีไฮเดรชัน (dehydration) และไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ให้สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน ได้แก่ ไซยานิดิน เฟลาโกนิดิน และ เดลฟินิดิน ซึ่งให้สีแดง ส้ม และม่วง ตามลำดับ



รูปที่ 2.6 วิธีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

ที่มา: www.herbalchem.net

2.3 การควบคุมชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

การสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์พืช ประกอบไปด้วยการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่มคือ ยีนควบคุม (regulatory gene) และ ยีน โครงสร้าง (structural gene)

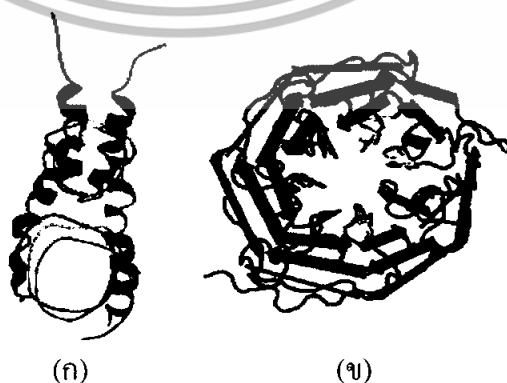
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ยีนควบคุม

ยีนควบคุม คือยีนซึ่งจะอยู่ห่างไปบนสาย DNA เดียวกัน มีหน้าที่ควบคุมยีน โครงสร้างโดยสร้างโปรตีนกดดัน (repressor protein) ซึ่งสามารถจับกับยีนดำเนินการและขัดขวาง หรือส่งเสริมการทำงานของอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสเพื่อสร้าง mRNA ซึ่งยีนควบคุมในชีวสังเคราะห์ แอนโทไซยานินที่นิยมศึกษาซึ่งให้โปรตีนควบคุม 3 กลุ่ม ได้แก่ MYB, basis helix-loop-helix (bHLH) และ WD40 repeats (WDR) โปรตีนทั้ง 3 กลุ่มนี้เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่มีหน้าที่สำคัญคือ เป็นโปรตีนที่มีบริเวณจับกับดีเอ็นเอหรือโปรตีน (DNA or protein binding domain) เพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งให้เกิดการลอกรหัส (DNA activation domain)

โปรตีนในกลุ่ม myb มีลักษณะที่สำคัญคือ โปรตีนแต่ละตัวในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างเป็น helix-turn-helix ซึ่งประกอบด้วยบริเวณควบคุม Trp gene 3 แห่ง โปรตีน myb ในสัตว์จะมีบริเวณ รีพีท (repeat : R) 3 ชนิด คือ R1 R2 และ R3 ส่วนในพืชมักจะพบเพียง 2 ชนิด คือ R2 และ R3 ซึ่งจะมีการจับตัวกันเป็นโปรตีน R2R3 (Edward และ Grotewold, 1999) โปรตีนในกลุ่ม bHLH เป็น ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ทางด้านปลายอะมิโนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็นเบสและเป็น ไฮโดรฟิลิก 18 ตัว และตามด้วยบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิก 2 ส่วน จึงทำให้เกิดโครงสร้างแอมฟิ-พาทิก (amphipathic) ที่เป็น α -helices โดยมี loop สั้นๆแทรกอยู่ระหว่าง helix (Heiml และคณะ, 2003) ส่วนโดเมน WD40 repeat นั้นมีโปรตีนควบคุมจำนวนมากที่อยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งโดเมน WD40 มีส่วนช่วยในการจับกันระหว่างโปรตีน โดยทั่วไปโดเมนนี้จะประกอบไปด้วยรีพีทจำนวน 4-8 แห่ง และจะอยู่ในรูปของ β -subunit ของจีโปรตีน heterotrimeric (Fong และคณะ, 1986)

จากการศึกษาพบว่ามีการทำงานร่วมกันของโปรตีนควบคุมทั้ง 3 กลุ่มนี้ เช่น โปรตีน C1 ในกลุ่ม MYB ซึ่งควบคุมวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโพด จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนในกลุ่ม bHLH ในการกระตุ้นโปรโมเตอร์ของยีน DFR เป็นต้น



รูปที่ 2.7 โครงสร้างจำลองของโปรตีนในกลุ่ม bHLH (ก) และกลุ่ม WD40 (ข)

ที่มา: www.usask.ca

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ยีนโครงสร้าง

ยีน โครงสร้างจะถูกถอดรหัสและแปลรหัสให้ได้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของร่างกาย โดยในชีวสังเคราะห์ของฟลาโวนอยด์มียีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องอยู่หลายชนิด ตัวอย่างยีนที่ทำการศึกษา เช่น ยีน *CHS* ให้เอนไซม์แซลโคเนซินเทส (chalcone synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ขั้นต้นแรกของชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์ และยีน *F3'H* (flavonoid 3'-hydroxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เติมหมู่ไฮดรอกซีให้แก่สารกลุ่มฟลาโวนินให้เป็นสารกลุ่มไฮโดรฟลาโวนอล เป็นต้น

2.4 ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิดอปซิส

2.4.1 *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1)* (Walker และคณะ, 1999)

TTG1 เป็นยีนที่ควบคุมการวิถีทางชีวเคมีหลายๆวิถีในอะราบิดอปซิส เช่น การพัฒนาขนที่ใบ ลำต้น และราก การสร้างเมือกในเมล็ด และการสะสมของเม็คสีแอนโทไซยานิน ยีนบริเวณนี้ให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 341 ตัวซึ่งมีโครงสร้างอยู่ในกลุ่ม WD40 โดยมี 4 รีพีท

2.4.2 *TRANSPARENT TESTA 8 (TT8)* (Nesi และคณะ, 2000)

TT8 เป็นยีนควบคุมรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในกลุ่มของ bHLH ซึ่งจำเป็นต่อการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่อยู่ปลายวิถีชีวสังเคราะห์ของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE (DFR)* ซึ่งควบคุมขั้นต้นแรกในการเปลี่ยนสารตัวกลางในวิถี (intermediate) ให้เข้าสู่การสร้างแอนโทไซยานินและ โปรแอนโทไซยานินดิน และ *BANYULS (BAN)*

2.4.3 *TRANSPARENT TESTA 2 (TT2)* (Nesi และคณะ, 2001)

ยีน *TT2* จะให้โปรตีนในกลุ่ม R2R3MYB ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน OsMYB3 ในข้าว และแฟกเตอร์ COLORLESS1 ในข้าวโพด *TT2* เป็นยีนหลักในการควบคุมให้มีการสร้างโปรแอนโทไซยานินดิน สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *BAN (BANYULS)* ซึ่งกำหนดรหัสเอนไซม์ที่นำสารตัวกลางเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์คาเทชิน และโปรแอนโทไซยานินดินในเมล็ดอ่อน และรากได้

จากการศึกษาการทำงานของยีนควบคุมในอะราบิดอปซิสพบว่า โปรตีนจากยีน *TT2 TT8* และ *TTG1* มีการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างซับซ้อนที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *BAN* โดย *TT2* มีหน้าที่ในการจดจำโปรโมเตอร์เมื่อจับกับ *TT8* ส่วน *TTG1* มีหน้าที่ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานกลุ่มโปรตีนนี้ และทำให้ *TT8* มีความคงตัว (Baudry และคณะ, 2004)

ตารางที่ 2.1 แสดงยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชต่างๆ

โดเมน	ข้าวโพด	พืทูเนีย	สแนปครากอน	เพอริลา	อะราบิดอปซิส
bHLH	<i>r, b, sn, lc</i>	<i>jaf13, an1</i>	<i>Delila</i>	<i>Myc-rp,</i> <i>Myc-F3G1</i>	<i>TT8</i>
MYB	<i>c1, pl</i>	<i>an2, mybPh3</i>	<i>Rosea</i>	<i>Myb-p1,</i> <i>Myb-C05</i>	<i>TT2, pap1,</i> <i>pap2</i>
WD40	<i>pac1</i>	<i>an11</i>	-	<i>PFWD</i>	<i>TTgl</i>

ที่มา : Yamazaki และคณะ (2002)

2.5 การโคลนยีน (gene cloning)

การโคลนยีนหรือดีเอ็นเอหมายถึงการเพิ่มปริมาณยีนให้เหมือนกับยีนต้นแบบ การโคลนเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตก็หมายถึงการเพิ่มปริมาณเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตต้นแบบหรือมีโอโทปต์ต้นแบบ ผลผลิตที่ได้จากการโคลนเรียกว่า โคลน (clone)

2.5.1 การเตรียมยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการ

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการนั้น เป็นขั้นตอนแรกของการโคลนยีนซึ่งดีเอ็นเอสามารถเตรียมได้จากวิธีต่างๆ คือ

1. ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ ซึ่งจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่ได้สามารถนำมาใช้ทำเป็น gene bank หรือ genomic DNA library เพื่อเป็นแหล่งเก็บรวบรวมยีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้น หรือเฉพาะบางยีนที่ต้องการของสิ่งมีชีวิตไว้ในหลอดทดลอง โดยการคัดเลือกยีนจากสายดีเอ็นเอบนโครโมโซม สามารถทำให้สายดีเอ็นเอถูกตัดออกเป็นท่อนๆ ได้ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะภายในสายดีเอ็นเอ (restriction endonuclease) หรือโดยใช้คลื่นเสียง (ultrasonication) แล้วจึงคัดเลือกยีนดีเอ็นเอที่มียีนที่เราต้องการ

2. การสังเคราะห์ เป็นการสร้างยีนขึ้นมาโดยตรง ยีนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นี้เป็นยีนท่อนสั้นๆ ยีนของโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆไป มักมีความยาวหลายร้อยหรือเป็นพันเบส สังเคราะห์ได้ยากมากหรือกล่าวได้ว่าสังเคราะห์ไม่ได้

3. การสร้างยีนโดยอาศัย เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) เป็นแม่แบบ โดยใช้เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) ซึ่งทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอโดยอาศัย mRNA เป็นแม่แบบโดยตรง ซึ่งอาศัยความจำเพาะของการจับคู่เบสสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะมีการเรียงตัวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบสสอดคล้องกันกับการเรียงตัวของเบสบนสาย mRNA สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นโดยวิธีนี้จึงได้ชื่อว่า คอมพลีเมนทารี ดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA

ดีเอ็นเอจากแหล่งต่างๆ ดังกล่าวต้องนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาดต่างๆ เพื่อเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์เอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่ใช้เป็นเอนไซม์ที่สามารถจดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ตัดอาจเป็นการจดจำ 4 หรือ 6 คู่เบส ตัวอย่างเช่น *EcoRI* *SmaI* สามารถจดจำลำดับ 6 คู่เบส ส่วน *TaqI* *AluI* และ *HaeIII* สามารถจดจำลำดับ 4 คู่เบส เป็นต้น ตัวอย่างของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตและลำดับเบสที่จดจำได้แสดงไว้ที่ตารางที่ 2

ตารางที่ 2.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่ผลิต	ลำดับเบสและตำแหน่งที่ตัด
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter</i>	5'- -A-G-C-T- -3' 3'- -T- C-G-A--5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	5'- -G-G-A-T-C-C- -3' 3'- -C-C-T-A-G-G- -5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'- -G-A-A-T-T-C- -3' 3'- -C-T-T-A-A-G- -5'
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'- -C-C-T-G-G- -3' 3'- -G-G-A-C-C- -5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aeryptius</i>	5'- -G-G-C-C- -3' 3'- -C-C-G-G- -5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae b</i>	5'- -A-A-G-C-T-T- -3' 3'- -T-T-C-G-A-A- -5'
<i>PstI</i>	<i>Providencia sturtii</i>	5'- -C-T-G-C-A-G- -3' 3'- -G-A-C-G-T-C- -5'
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5'- -G-T-C-G-A-C- -3' 3'- -C-A-G-C-T-G- -5'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 เวกเตอร์ (vector)

เวกเตอร์ คือ ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากๆ โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการดังกล่าวมาเชื่อมต่อเข้าไปกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA; rDNA) จากนั้นจึงนำ rDNA ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) โดยวิธีการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการต่อไป ปัจจุบันมีเวกเตอร์ต่างๆ มากมายที่ใช้สำหรับการโคลนนิ่ง ซึ่งการเลือกใช้เวกเตอร์นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทำงาน เช่นถ้าต้องการโคลนนิ่งในแบคทีเรีย อาจเลือกใช้เวกเตอร์ที่เป็น พลาสมิด (plasmid) ฟาจ (phage) และ คอสมิด (cosmid) หรือถ้าต้องการโคลนนิ่งในเซลล์สัตว์อาจใช้เวกเตอร์ที่เป็นไวรัส SV40 ขณะที่ในเซลล์พืชไวรัสพวก Cauliflower Mosaic Virus (CMV) และ Ti plasmid อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาเวกเตอร์ที่สามารถจำลองตัวเองได้ในเซลล์เจ้าบ้านมากกว่า 1 ชนิด ที่เรียกว่า Shuttle vector เช่น ใน *E. coli* และยีสต์ (yeast) เป็นต้น

2.5.3 การนำยีนหรือดีเอ็นเอมาเชื่อมกับเวกเตอร์

นำ Genomic DNA ของสิ่งมีชีวิตมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปถ่ายในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อขยายปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ แล้วเก็บเซลล์เจ้าบ้าน หรือเก็บเวกเตอร์ไว้ที่ -80°C องศาเซลเซียสเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี ดังนี้

1. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว (cohesive end ligation) การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เข้ากับเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน
2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ซึ่งทำได้ยากกว่าการเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว ดังนั้นจึงอาจนำดีเอ็นเอปลายทู่มาเชื่อมต่อกับตัวเชื่อม (DNA linker) ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งจะตัดได้ปลายเหนียว
3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สม เกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่ง โดยใช้เอนไซม์เทอร์มินอล ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทล ทรานสเฟอเรส (terminal deoxyribonucleotidyl transferase) เติมไฮโมพอลิเมอร์ที่เป็นคู่สมกันที่ปลายสองข้างของดีเอ็นเอ

2.5.4 การนำเวกเตอร์ถูกผสมเข้าสู่เซลล์

การนำเวกเตอร์ถูกผสมเข้าสู่เซลล์ผู้รับ เช่น *E. coli* โดยทำให้เซลล์ผู้รับอยู่ในสภาพที่พร้อมหรือเหมาะสม เรียกว่า เซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) ซึ่งสามารถกระทำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยการใช้สารเคมี เช่น CaCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 , KCl , dimethylsulfoxide ที่อุณหภูมิ 0 - 42 องศาเซลเซียส หรือใช้ไฟฟ้าเพื่อให้เกิดรูหรือช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นก็นำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าไปในเซลล์ผู้รับ เรียกกระบวนการนี้ว่า การทรานสฟอร์ม (transformation) และเรียกเซลล์ผู้ที่มีเวกเตอร์ลูกผสมนี้ว่า ทรานสฟอร์มแมนต์ (transformant) เมื่อทรานสฟอร์มแมนต์มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นหรือดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปนั้นเพิ่มจำนวนขึ้นด้วย

2.5.5 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์ มาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตนั้น (genomic DNA) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีจำนวนมากมาย หรือเป็นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์มาจากอาร์เอ็นเอซึ่งก็มีมากมายหลายชนิดเช่นเดียวกัน เมื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับแล้วจึงมีเซลล์จำนวนมากและแต่ละเซลล์ได้รับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการด้วยวิธีต่างดังนี้

1. การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection) วิธีนี้เหมาะสำหรับยีนที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์นั้นเป็นยีนที่สามารถแสดงออกได้ในเซลล์เจ้าบ้านได้และเซลล์เจ้าบ้านจะต้องไม่มียีนนั้นอยู่ เช่น ใส่ยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การตรวจสอบโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี (immunochemical screening) เป็นวิธีที่คล้ายกับวิธีแรกแต่กรณีโปรตีน (gene product) ไม่แสดงฟีโนไทป์ที่ชัดเจนทำให้ไม่สามารถตรวจสอบโดยตรงได้ ดังนั้นจึงต้องใช้แอนติบอดี (antibody) ที่จะเข้าไปเกาะกับแอนติเจน (antigen) ซึ่งโปรตีนที่ได้จากยีนที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์

3. การตรวจสอบโดย nucleic acid hybridization การตรวจสอบยีนที่ต้องการใน recombinant vector ที่อยู่ใน host cell โดยใช้หลักการคือ ทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก แล้วทำให้ดีเอ็นเอสายคู่อยู่ในสภาพสายเดี่ยว จากนั้นใช้ DNA probe หรือ RNA probe หรือ oligo nucleotide ที่อยู่ในสภาพสายเดี่ยว และติดฉลากด้วย P-32 นำมาเกาะจับ (hybridization) กับยีนที่ต้องการ

2.6 การถ่ายโอนยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (หัตยา, 2548)

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค คราวน็อกอลล์ (crown gall) ในพืชใบเลี้ยงคู่ โดยทำให้เกิดปุ่มปมบริเวณโคนลำต้นส่วนที่ต่อกับราก (crown) เนื่องจากตำแหน่งโคนลำต้นอยู่บริเวณผิวดินทำให้เกิดบาดแผลได้ง่าย (อาจเนื่องจากการเคลื่อนที่ของเม็ดดินทรายเมื่อถูกลมพัด) และติดเชื้อจากแบคทีเรียเกิดเป็น โรคคอกอลล์ *A. tumefaciens* สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ทุกส่วน และชักนำให้เกิดคอกอลล์ได้ ขณะที่ *A. tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืช เซลล์พืชจะเริ่มต้นแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นปุ่มปม ขณะเดียวกันก็จะสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของอาร์จินินที่เรียกโอพีน (opine) ซึ่งอาจจะเป็นโนพารีน (nopaline) หรือออกโทพีน (octopine) ขึ้นอยู่กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สายพันธุ์ *A. tumefaciens* เพราะแต่ละสายพันธุ์จะใช้โอพินจำเพาะของตนเป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต สิ่งที่น่าสนใจคือ *A. tumefaciens* สามารถทำให้พืชสังเคราะห์โอพินที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยที่โอพินที่สังเคราะห์ขึ้นมาไม่ได้มีประโยชน์ใดๆ ต่อพืชเลย

ความสามารถของ *A. tumefaciens* ในการชักนำให้พืชสร้างคราวน์กอลล์ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมที่อยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ (ประมาณ 200000 คู่นิวคลีโอไทด์) เรียกพลาสมิด Ti (Ti plasmid มาจาก tumor-inducing capacity) ส่วนประกอบ 2 ส่วนในพลาสมิด Ti คือ T-DNA (transferred DNA) และส่วน vir (virulence) ที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงเซลล์พืช T-DNA จะหลุดออกจากพลาสมิด Ti เข้าสู่เซลล์พืช และสอดแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอของเซลล์พืชโดยสุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าบางครั้ง T-DNA หลายชิ้นสอดแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอของเซลล์พืชเซลล์เดียวกัน

จากคุณสมบัติที่ T-DNA สามารถถ่ายทอดจากพลาสมิดของแบคทีเรียเข้าไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของเซลล์พืชได้ ทำให้นักวิจัยเห็นถึงศักยภาพในการใช้ *A. tumefaciens* เป็นตัวกลางในการตัดต่อยีนในพืช โดยการสอดแทรกยีนที่ต้องการเข้าไปใน T-DNA เพื่อให้เข้าไปสอดแทรกในดีเอ็นเอของเซลล์พืช ผลการวิจัยพบว่าสามารถทำได้ดังที่คาดหวัง แต่ปัญหาคือ T-DNA ที่เข้าไปจะทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวผิดปกติ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ ดังนั้นหลังจากการพบยีน *Tum* บน T-DNA ที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ผิดปกติ นักวิจัยจึงสร้างพลาสมิดชนิดใหม่เรียก disarmed Ti ซึ่งมีเบสในยีน *Tum* ขาดหายไปทำให้เซลล์บางตัวปกติ ขณะเดียวกันต้องหายีนที่เป็นมาร์คเกอร์สำหรับจำแนกเซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA ของ disarmed Ti เข้าไป (ปกติจะจำแนกได้จากกรเกิดปุ่มปม) ผลการวิจัยพบว่ายีนที่เหมาะสมสำหรับเป็นมาร์คเกอร์ในการจำแนกคือ ลักษณะต้านต่อยา สารปฏิชีวนะหรือสารเคมีอื่นๆที่สามารถทำให้พืชที่ได้รับ T-DNA สามารถเจริญได้อย่างปกติ ปัจจุบันนิยมใช้ยีนมาร์คเกอร์ 3 ยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคือ คานามัยซินและอะมิโนไกลโคไซด์ (kanamycin และ aminoglycoside) ไฮโกรมัยซิน (hygromycin) และ เมโทเทรกเซท (methotrexate)

ปัจจุบันการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวกลางในการสร้างพืชตัดต่อพันธุกรรมเป็นวิธีที่นิยมทำกันมากที่สุด แต่วิธีการทำก็ควรจะเปลี่ยนจากการใส่เชื้อแบคทีเรียลงในต้นพืช มาเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับ *A. tumefaciens* คัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับ Ti นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

83991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปฏิกิริยาอุทกโพลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) (สุรินทร์, 2548)

PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นสั้นๆซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน ช่วยให้สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นได้ โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำมาโคลนก่อน หลักการทำ PCR ขั้นแรกต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจก่อน อาจทราบเฉพาะช่วงปลายของยีนนั้นก็ได้ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 ชนิด แต่ละชนิดมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3' ของเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการนั้น เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ (primer) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบส นำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดไปรวมกับดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) โดยใส่ในปริมาณที่มากเกินพอ ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน แล้วจึงลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับสายปลายของยีนที่ต้องการ และมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนอื่นๆมากๆ เข้ามาจับคู่ (anneal) กับเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการอย่างถูกต้อง เปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ก็จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น ถ้าเริ่มต้นมียีนที่สนใจเพียง 1 โมเลกุล เมื่อผ่านรอบที่ 1 ก็จะมี 2 โมเลกุล แล้วจึงเริ่มรอบที่ 2 ต่อไปโดยเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอเสถียรสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว ลดอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการจับตัวของไพรเมอร์กับส่วนปลายของดีเอ็นเอขึ้น แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใส่ลงไป ทำเช่นนี้ 30-40 รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นล้านๆเท่า

ถ้าใช้เอนไซม์โพลิเมอร์เรสจาก *E. coli* หรือจากเซลล์อื่นๆ เมื่อทำให้ดีเอ็นเอเสถียรสภาพโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็จะเสถียรภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไป ในปฏิกิริยาทุกๆ รอบของการสังเคราะห์ ต่อมาได้ค้นพบเอนไซม์แทกดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสได้ จึงนิยมใช้ใน PCR เพราะประหยัดทั้งเวลาและเอนไซม์ ปัจจุบันมีการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น การโคลนยีนโดยไม่ผ่านการเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย การตรวจหาความผิดปกติของยีนที่ทำให้เกิดโรคต่างๆในคน เป็นต้น

2.8 การสกัดแอนโทไซยานิน (Cominelli และคณะ, 2007)

การตรวจวัดการสะสมสารแอนโทไซยานินในพืชทำได้โดย นำใบพืชตัวอย่างประมาณ 50-100 มิลลิกรัมใส่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัดตัวอย่างด้วยเมทานอลที่มีกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 คืน ตามด้วยการเติมน้ำที่ปราศจากประจุ 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตรและทำการสกัดคลอโรพอร์ม นำส่วนใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นประมาณ 530-675 นาโนเมตร

2.9 คลอโรฟิลล์

ในพืชสีเขียวซึ่งสังเคราะห์แสงได้ ประกอบด้วยรงควัตถุจำพวกคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ทำหน้าที่สำคัญในการดูดกลืนแสง และกระตุ้นปฏิกิริยาแสงในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุชนิดอื่นๆ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไฟโคบิลิน (phycobilin) ไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) ซึ่งมีสีส้ม สีน้ำเงิน และแดง ตามลำดับ รงควัตถุเหล่านี้จัดเป็นรงควัตถุประกอบ (accessory pigment) ทำหน้าที่รับแสงและส่งพลังงานกระตุ้นให้แก่โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ที่อยู่ถัดไป

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียวที่พบมากในพืช คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ บี ซี และดี เป็นต้น คลอโรฟิลล์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการดูดแสงช่วงคลื่นต่างๆของคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดต่างกันด้วย คลอโรฟิลล์มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ทำหน้าที่ดูดพลังงานแสง ส่วนนี้มีโครงสร้างเป็นไฟโรลแบบวงแหวน 4 วง โดยมีแมกนีเซียมไอออนเป็นศูนย์กลาง และมีส่วนหัวเป็นไฮโดรคาร์บอนช่วยยึดรงควัตถุกับระบบแสง คลอโรฟิลล์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างแตกต่างกันเล็กน้อย ทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงต่างกันไปบ้าง

ในพืชพบว่าคลอโรฟิลล์เอ ดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวช่วงคลื่นซึ่งมีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่ 680 และ 760 นาโนเมตร เรียก P_{680} และ P_{760} ตามลำดับ สำหรับคลอโรฟิลล์บีสามารถดูดแสงได้ดีในหลายความยาวคลื่น ได้แก่ 480 640 และ 650 นาโนเมตร ส่วนคลอโรฟิลล์ซีดูดแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 645 นาโนเมตร ได้ดีที่สุด โดยปกติคลอโรฟิลล์ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ อีเธอร์ อะซีโตน เป็นต้น ในพืชชั้นสูงจะพบคลอโรฟิลล์เอและบีมาก ส่วนในพืชชั้นต่ำจะพบคลอโรฟิลล์ชนิดอื่นๆ และรงควัตถุ เช่น แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน อยู่มาก

สำหรับรงควัตถุประกอบพวก แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน สามารถดูดกลืนแสงและผ่านพลังงานแสงไปยังคลอโรฟิลล์เอ ทำให้คลอโรพลาสต์เก็บเกี่ยวพลังงานแสงซึ่งคลอโรฟิลล์เอไม่สามารถดูดกลืนไว้ได้ ทั้งนี้เนื่องจากคลอโรฟิลล์เอ ไม่สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพทุกช่วงคลื่น

2.10 พลังงานแสง

แหล่งของพลังงานแสงที่สำคัญที่สุดคือ ดวงอาทิตย์ แสงมีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) มีความยาวช่วงคลื่นต่างๆกัน แสงอาทิตย์ที่ส่องมายังพื้นโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความยาวช่วงคลื่นระหว่าง 200-5000 นาโนเมตร สามารถจัดแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ แสงช่วงคลื่นสั้น (short wave) มีความยาวคลื่นช่วงต่ำกว่า 380 นาโนเมตร ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต เอ็กซ์เรย์ และรังสีแกมมา เป็นต้น แสงช่วงคลื่นสั้นเหล่านี้เป็นแสงที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ชั้นโอโซนในบรรยากาศสามารถดูดกลืนและลดอันตรายอันเกิดจากแสงช่วงคลื่นสั้นเหล่านี้ได้ ส่วนแสงที่มีความยาวคลื่นช่วงคลื่นมากกว่า 760 นาโนเมตรจัดเป็นแสงช่วงคลื่นยาว (long wave) ได้แก่ แสงฟราเรด และ อินฟราเรด ซึ่งถ้ามีการสะสมของแสงเหล่านี้มากจะทำให้เปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนที่สูงเกินไปได้ สำหรับแสงช่วงคลื่นยาวสามารถถูกดูดโดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไอน้ำในบรรยากาศ ส่วนแสงที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 380-760 นาโนเมตร เป็นแสงช่วงที่ตาเราสามารถมองเห็นได้ (visible light) ประกอบด้วยแสงสีต่างๆ คือ ม่วง คราม น้ำเงิน เขียว เหลือง ส้ม และแดง แสงช่วงคลื่นนี้จะประ โยชน์ต่อพืช ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้

2.10.1 ปัจจัยของแสงที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสง

แสง มีบทบาทต่อการสร้างอาหารของพืช ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

2.10.1.1 ความเข้มของแสง (light intensity) มีผลต่อการเจริญและกระบวนการสร้างอาหารในพืช ถ้าพืชได้รับความเข้มของแสงสูงหรือต่ำเกินไปปริมาณความต้องการ จะมีผลทำให้พืชไม่เจริญเติบโต พืชบางชนิดสามารถปรับตัวให้มีสภาพเหมาะสมในแหล่งที่มีความเข้มของแสงสูงโดยเฉพาะในพืชเขตร้อน ถ้าความเข้มของแสงมากเกินไปเกินจุดอิ่มตัว (light saturation point) อาจทำให้ใบไหม้กรียมตายได้

ถ้าปริมาณความเข้มของแสงต่ำ พืชจะมีการสังเคราะห์แสงต่ำ พืชไม่สามารถลดอัตราการหายใจให้ต่ำลงไปด้วย ในสภาพที่อัตราการสังเคราะห์แสงเท่ากับอัตราการหายใจ หรือจำนวนคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งพืชตรึงไว้เท่ากับจำนวนคาร์บอนไดออกไซด์ที่พืชปล่อยมา ที่จุดนี้การแลกเปลี่ยนก๊าซมีค่าเท่ากับศูนย์ เราเรียกจุดนี้ว่า light หรือ carbon dioxide compensation point ถ้าพืชได้รับแสงต่ำกว่าจุดนี้จะไม่เจริญและตายในที่สุด

2.10.1.2 ความยาวคลื่นแสง (light duration) อัตราการสังเคราะห์แสงจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับความยาวของช่วงวันเมื่อสภาพแวดล้อมอื่นๆคงที่ พืชที่ได้รับแสงในช่วงวันที่ยาวมีโอกาสรับแสงนานทำให้การสังเคราะห์แสงมากขึ้น ดังนั้นในการเร่งการเจริญเติบโตของพืชเมืองหนาว อาจทำได้โดยเพิ่มแสงไฟฟ้าให้แก่พืชในเรือนกระจก ในขณะที่เดียวกันอาจมีผลต่อการออกดอกของพืชบางชนิดได้

2.10.1.3 คุณภาพของแสง (light quality) รังสีจากดวงอาทิตย์ที่ส่องมายังพื้นโลก เฉพาะช่วงแสงที่มองเห็นมีความยาวช่วงคลื่น 400-760 นาโนเมตรเท่านั้น ที่พืชนำไปใช้ใน

กระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังพบว่าแสงสีแดงและแสงสีน้ำเงินมีผลต่อกิจกรรมการสังเคราะห์แสงมากกว่าแสงในช่วงคลื่นอื่นๆ

2.10.2 ความเครียดที่เกิดจากแสง

ถึงแม้ว่าพืชจะสามารถดึงพลังงานแสงมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ แต่พลังงานแสงที่มากเกินไปก็สามารถทำอันตรายต่อพืชได้เช่นกัน เช่น เกิดการเสียหายของไทลาคอยด์ (thylakoid) ในคลอโรพลาสต์ เกิดการสลายของคลอโรฟิลล์ แม้แต่พืชที่ชอบขึ้นในที่โล่งแจ้ง หรือต้องการแสงในปริมาณที่มาก ก็ยังอาจเกิดอันตรายจากแสงที่มากเกินไปได้เช่นกัน หากเกิดความผิดปกติใดๆขึ้นกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในกลไกของวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) รังสีอัลตราไวโอเล็ตในแสงอาทิตย์ยังสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่างๆ และ โปรโตพลาสซึมได้ รวมทั้งทำให้เกิดความผิดปกติกับโมเลกุลของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ได้อีกด้วย

พืชอาจมีการปรับตัวเพื่อลดสภาวะเครียดที่เกิดจากแสงที่มากเกินไปได้หลายวิธี เช่น การปรับมุมของใบให้ตั้งมากขึ้น เพื่อรับแสงให้น้อยลง มีการสร้างขนปกคลุมส่วนต่างๆ เช่น ใบหรือปลายยอดอย่างหนาแน่นซึ่งจะช่วยสะท้อนแสงออกไปได้มากขึ้น หรือผลิตสารสีฟลักแอนโทไซยานินมากขึ้น ซึ่งจะช่วยกรองแสงที่จะเข้าสู่เซลล์ในชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) ได้ในระดับหนึ่ง หรือที่เนื้อเยื่อผิวอาจมีการสร้างชั้นคิวติเคิล (cuticle) หนาขึ้น ซึ่งจะช่วยกรองแสง โดยเฉพาะรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังอาจมีการสร้างหรือผลิตสารสีในกลุ่มคาโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมบางอย่างของสารในกลุ่มคาโรทีนอยด์นี้สามารถลดพลังงานส่วนเกิน ที่เกิดจากพลังงานที่พืชได้รับมากเกินไปได้ ซึ่งเป็นการลดอันตรายที่อาจเกิดกับเซลล์ได้

แอนโทไซยานินเป็นสารที่มีส่วนสำคัญในการป้องกันสภาวะเครียดที่เกิดจากแสงต่อต้นพืช นอกจากการช่วยป้องกันแสงยูวีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชแล้ว สารกลุ่มนี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมและจากแสงยูวีได้ด้วย เนื่องจากสารในกลุ่มแอนโทไซยานินมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซี (OH) ซึ่งมีคุณสมบัติในการดักจับอนุมูลอิสระ แสงจึงเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน โดยเฉพาะแสงสีฟ้าและแสงยูวี

จากการศึกษาผลของแสงต่อการสะสมสารกลุ่มฟลโวนอยด์ก่อนหน้านี้นี้พบว่า การให้แสงยูวีบีที่ความเข้ม 12.6 25.3 และ 37.9 กิโลจูลต่อตารางเมตร แก่เซลล์ของพืช *Passiflora quadrangularis* เป็นเวลานาน 2 4 และ 7 วัน พบว่ามีการสะสมของสารกลุ่มไกลโคซิล

เฟลโวนอยด์ (glycosyl flavonoid) สูงที่สุดที่ความเข้มแสง 25.3 กิโลจูลต่อตารางเมตรเป็นเวลา 7 วัน (Antognoni และคณะ, 2007)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 ต้นยาสูบ *Nicotina tobaccum*
- 3.1.2 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*
- 3.1.3 เชื้อ *E. coil*
- 3.1.4 สารเคมี
 - 3.1.4.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนเชื่อมต่อ
 - 3.1.4.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ
 - 3.1.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Competent cell
 - 3.1.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน
 - 3.1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส
 - 3.1.4.6 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้
 - 3.1.5.1 ประเภทเครื่องแก้ว
 - บีกเกอร์
 - ปิเปต
 - ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - จาน Petri dishes
 - แuantงแก้วคน
 - ขวดวัดปริมาตร
 - กระจกตวง
 - 3.1.5.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ
 - ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - ไมโครปิเปตและทิปขนาดต่างๆ
 - ซ้อนตักสาร
 - กระจกชั่งสาร
 - ปากคืบ
 - มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องซังสารไฟฟ้าแบบหยาบและแบบละเอียด
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้เย็น
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- เตาอบความร้อน (hot air oven)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- Water bath
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้บ่ม (incubator)
- อุปกรณ์ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส
- หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
- หลอดเบตติกไลท์ (black light)
- หลอดโกลด์ลักซ์ (gold lux)

3.1.6 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การโคลนยีน

3.2.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ *TT8*

นำเวกเตอร์ที่มียีน *TT8* แทรกอยู่ คัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* เพื่อแยกยีน *TT8* ออกจากเวกเตอร์ *pGEM* แล้วนำไปทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ หลังจากนั้นแยกชิ้นส่วนยีนจากเจลอะกาโรส โดยใช้ *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* ของ Amersham Pharmacia Biotech ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

หลังจากแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการออกจากเจลแล้ว ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ *pBI121* โดยปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซันดีเอ็นเอ TT8	3.5	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pBI121	2.5	ไมโครลิตร
2X ligase buffer	7.5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1.5	ไมโครลิตร
รวม	15	ไมโครลิตร

บ่ม 22 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการทำคอมพลีเทนต์ (completent) แล้ว เลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน (kanamycin) เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดียวที่เกิดขึ้นเพียงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำมาทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบการถ่ายโอนยีนด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์

3.2.1.3 การตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pBI121

นำสารละลายดีเอ็นเอจากการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบพลาสมิดที่มีซันดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกิริยาดังนี้

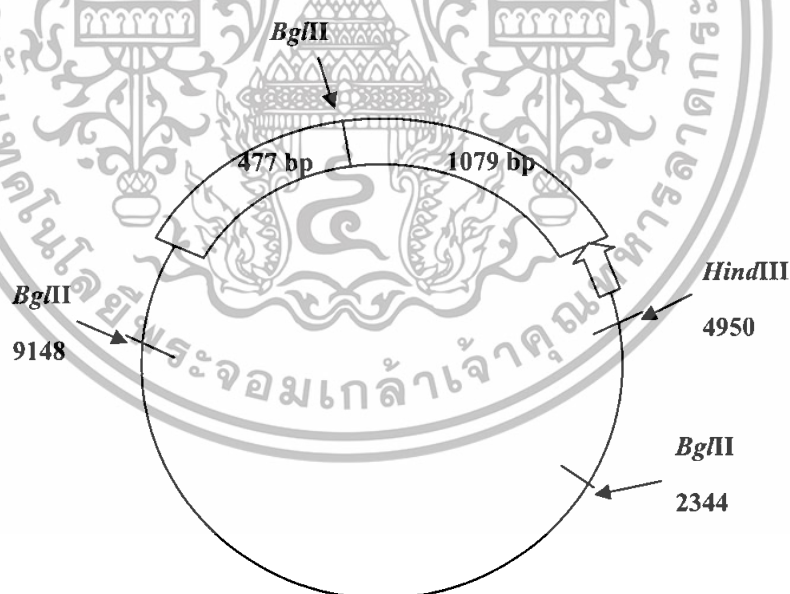
พลาสมิดที่คัดเลือกได้	4	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.2	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4.7	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และทำการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอและพลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bg*II และ *Hind*III ซึ่ง มีปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	5	ไมโครลิตร
10X buffer C	1.2	ไมโครลิตร
<i>Bg</i> III (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Hind</i> III (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.12	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.53	ไมโครลิตร
รวม	12.15	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากข้อมูลของ GenBank *TT8* มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bg*III และพลาสมิด pBI121 มีจุดตัดจำเพาะของทั้ง *Bg*III และ *Hind*III ซึ่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *TT8* และ พลาสมิด pBI121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโครแบคทีเรีย

ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *T78* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทางเข้าสู่เชื้ออะโครแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งอะโครแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pBI121 จะสามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินได้

3.2.2.1 การตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโครแบคทีเรีย

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโครแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินจากข้อ 3.2.2 นำมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *T78* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับส่วน 35S promoter บนพลาสมิด pBI121 ได้ ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

พลาสมิดที่สกัดได้จากอะโครแบคทีเรีย	2	ไมโครลิตร
dNTP (10mM)	1	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM)	5	ไมโครลิตร
10X buffer	5	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5unit/ μ l)	0.5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	2	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	2	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	32.5	ไมโครลิตร
รวม	50	ไมโครลิตร

มีสถานะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบ

3.2.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโครแบคทีเรีย

3.2.3.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโครแบคทีเรีย

นำเชื้ออะโครแบคทีเรียจากข้อ 3.2.2 ที่มีพลาสมิดที่สร้างขึ้นเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. แล้วทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนของใบยาสูบขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ลงในสารละลายเชื้อจำนวน 50 ชิ้น เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS สูตรชักนำแคลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS สูตรชักนำแคลลัสที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคาเบนนิซิลินเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

3.2.3.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีนโดยอะโกรแบคทีเรีย โดยนับจำนวนชิ้นส่วนของใบที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสบนอาหาร MS สูตรชักนำแคลลัส ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินและคาเบนนิซิลิน

3.2.3.3 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

ทำการคัดเลือกยอดจากแคลลัสที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ มีลักษณะใบแผ่เหมือนต้นปกติและมีสีเขียวเข้ม ตัดยอดเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินและคาเบนนิซิลินเพื่อให้ยอดเจริญเป็นต้น คัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้นและใบมีสีเขียว และมีราก เลี้ยงบนอาหาร MS และตรวจสอบยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่คัดเลือกได้และตรวจสอบหา ยีนที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของพืช ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ T78 ซึ่งปฏิกิริยาดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอจากต้นยาสูบ	2	ไมโครลิตร
dNTP (10mM)	1	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM)	5	ไมโครลิตร
10X buffer	5	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5U/μl)	0.5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	34.5	ไมโครลิตร
รวม	50	ไมโครลิตร

มีสถานะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบ และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ศึกษาผลของความเข้มและชนิดแสงที่มีต่อการแสดงออกของพืชทดลอง

นำพืชทดลอง (ต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT8*, *F3'H*, *CHS* และ *PAP2*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์และอายุใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 2 ระดับคือ 500 และ 800 ลักซ์ และภายใต้แหล่งแสง 3 ชนิดได้แก่ หลอดฟลูออเรสเซนต์ หลอดแบล็คไลท์ และหลอดโกลด์ลักซ์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการสะสมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของพืชทดลองโดยเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

3.2.4.1 ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นพืชทดลองที่ตอบสนองต่อความเข้มและชนิดแสง

ทำการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากพืชทดลองด้วยอะซิโตนเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด และศึกษาการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในต้นพืชทดลอง โดยวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนแอลดีไฮด์ (MDA) ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) และกรดไธโอบาร์บิวริก (thiobarbituric acid) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 532 และ 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณเอ็มดีเอในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิกรัม

3.2.4.2 ศึกษาการผลิตสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของต้นพืชทดลองที่ตอบสนองต่อความเข้มและชนิดแสง

ทำการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยบดใบพืชสดและสกัดด้วยเมทานอลที่มีกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสารฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่มด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นประมาณ 300-560 นาโนเมตร

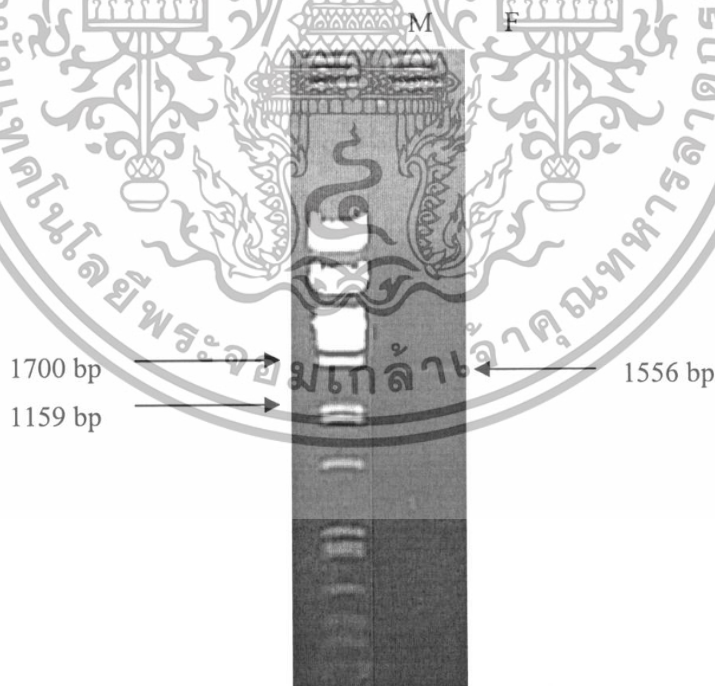
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การโคลนยีน

4.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ TT8

นำเวกเตอร์ pGEM ที่มีชิ้นส่วนของยีน TT8 แทรกอยู่ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI เพื่อแยกยีน TT8 ออกจากเวกเตอร์ pGEM จากนั้นแยกชิ้นส่วน TT8 ออกจากสารละลายโดยการใส่เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วพบว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 1159 และ 1700 คู่เบส ซึ่งจากข้อมูลใน GENBANK นั้น ชิ้นส่วนของ TT8 มีขนาด 1556 คู่เบส จึงคาดว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ คือ ยีน TT8 ดังรูป 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกชิ้นดีเอ็นเอจาก pGEM และทำให้

บริสุทธิ์ โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ (M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน F หมายถึง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอออกจาก pGEM)

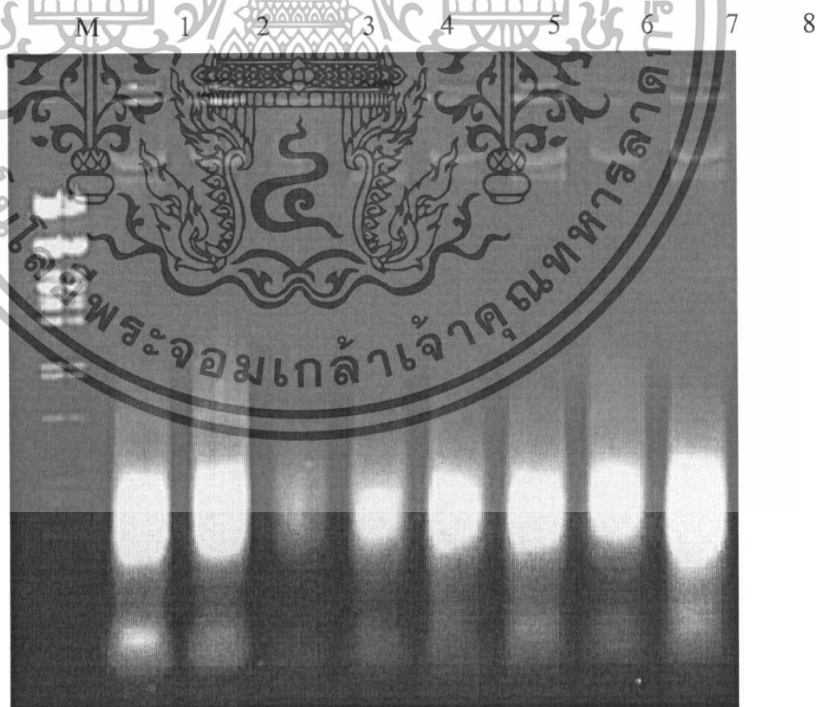
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pBI121 และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

E. coli

หลังจากแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการออกจากเจลแล้ว ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pBI121 โดยใช้เอนไซม์ไลเกส จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต่อกับเวกเตอร์และทำการคัดเลือกโคโลนีเดียวที่สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน ซึ่งคาดว่าโคโลนีที่สามารถขึ้นได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะนั้น เป็นเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ เนื่องจากบนเวกเตอร์ pBI121 นั้น มีบริเวณยีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน จึงเกิดการแสดงออกของยีนบริเวณนั้น ทำให้เซลล์ *E. coli* นั้นๆ สามารถต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซินได้

ทำการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัย และตรวจผลด้วยเทคนิคเจลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนี *E. coli* ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน (1-8 คือ หมายเลขโคลอนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pBI 121

นำสารละลายดีเอ็นเอจากการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เนื่องจากบริเวณที่ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์นั้น มีลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ทำให้สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเวกเตอร์

ถ้าหากพลาสมิดที่สกัดได้ประกอบด้วยเวกเตอร์ที่ต่ออยู่กับชิ้นดีเอ็นเอ หลังจากใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 พบว่าได้แถบของดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบของเวกเตอร์ pBI121 และชิ้นดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (1-8 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

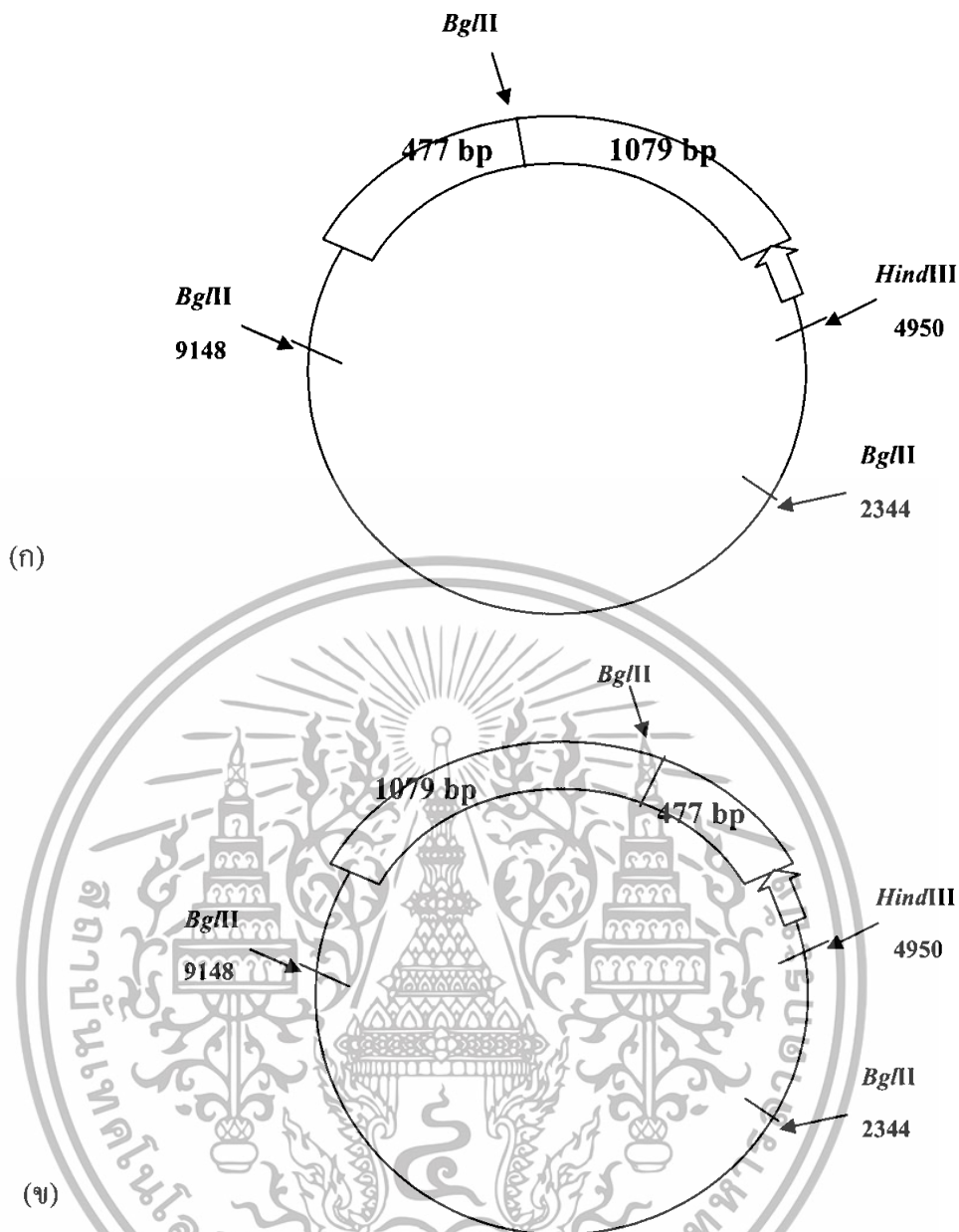
จากรูปพบว่าโคลนที่ 8 ปรากฏแถบของดีเอ็นเอ 2 แถบ คาดว่าแถบบนคือเวกเตอร์ pBI121 ส่วนแถบล่างคือชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดออกมาจากพลาสมิด ซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอนี้มีขนาดอยู่ระหว่าง 1770 และ 1159 คู่เบสของดีเอ็นเอมาตรฐานและมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้จากเวกเตอร์ pGEM จึงคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอนี้คือยีน *T78* ที่มีขนาด 1556 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ทิศทางการเชื่อมต่อระหว่างเวกเตอร์ pBI121 กับ *TT8* เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจาก GenBank แล้วพบว่าในเวกเตอร์ pBI121 มีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bgl*II 2 ตำแหน่ง และเอนไซม์ *Hind*III 1 ตำแหน่ง ส่วนชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* มีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bgl*II 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ตัดลงบนจุดตัดต่างๆบนพลาสมิดแล้ว จะมีผลให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ดังนี้ กรณีของเวกเตอร์ pBI121 ได้ดีเอ็นเอขนาด 2606, 4198 และ 6196 คู่เบส ในกรณีที่ชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* เข้าแทรกในเวกเตอร์ pBI121 อย่างถูกทิศทางการแสดงออกของโปรโมเตอร์ 35S (sense) ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 4 ชิ้นคือขนาด 1950, 2606, 3804 และ 6196 คู่เบส ส่วนในกรณีที่ชิ้น *TT8* แทรกอยู่ใน pBI121 อย่างกลับทิศทาง (antisense) ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 4 ชิ้นคือ 1348, 2606, 4406 และ 6196 ดังแสดงในรูปที่ 4.4



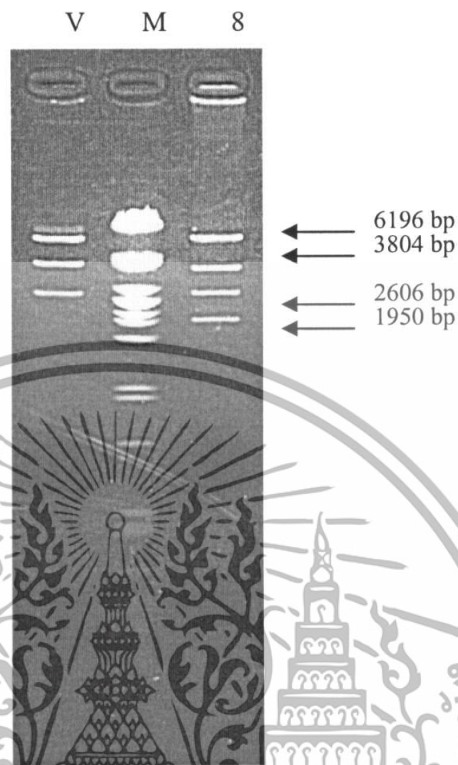
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Hind*III บนเวกเตอร์ pBI121 และดีเอ็นเอ *TT8* โดย (ก) คือพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *tt8* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทิศทาง (ข) คือพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่อย่างกลับทิศทาง

เมื่อนำพลาสมิดโคลนหมายเลข 8 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ตัว แล้วตรวจผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 ชิ้น คือ 6196, 3804, 2606 คู่เบส และมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่อยู่ระหว่างขนาด 1986 และ 1700 คู่เบสของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 ชิ้น คาดว่าเป็นขนาด 1950 คู่เบส ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างจากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอย่างกลับทิศทางอย่างเห็นได้ชัด จึงคาดว่าพลาสมิดจากโคลนหมายเลข 8 เป็นพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pBI121 อย่างถูกต้องทิศทาง ดังรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงพลาสมิดจาก โคลนหมายเลข 8 และเวกเตอร์ pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Hind*III (V คือ เวกเตอร์ pBI121 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 8 คือ พลาสมิดจาก โคลนหมายเลข 8)

4.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่โกรแบคทีเรีย

ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *TT8* แทรกอยู่อย่างถูกต้องเข้าสู่เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน และทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อโกรแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะจำนวน 4 โคลน ซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อโกรแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่ยีน *TT8* แทรกอยู่

4.2.1 การตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่โกรแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดียวของเชื้อโกรแบคทีเรียที่ได้มาสกัดพลาสมิด เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว พบว่าโคลนที่ 4 ได้รับพลาสมิด จึงนำโคลนที่ 4 มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดที่เชื้อโกรแบคทีเรียได้รับการถ่ายโอน โดยนำพลาสมิดมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วน 35S promoter บน พลาสมิด pBI121 พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ระหว่างขนาด 448 และ 339 คู่เบสของดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ผลของการพีซีอาร์พลาสมิดจากโคลนหมายเลข 4 โดยใช้ไพรเมอร์ 35S (M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 4 คือพลาสมิดจากโคลนหมายเลข 4 P3 คือผลจากการพีซีอาร์พลาสมิดจากโคลนหมายเลข 3 P4 คือผลจากการพีซีอาร์พลาสมิดจากโคลนหมายเลข 4)

4.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

4.3.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียและศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียจากข้อ 4.2 โคลนหมายเลข 4 ซึ่งมีพลาสมิดที่มียีน *TT8* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทิศทางกับ โปรโมเตอร์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. แล้วทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนของใบยาสูบขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ลงในสารละลายเชื้อจำนวน 50 ชิ้น เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS สูตรชกนำแคลต์ส ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS สูตรชกนำแคลต์สที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคาเบนนิซิลินเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียจากนั้น ทำ

เอกสารนี้เผยแพร่ฟรีทุกวันๆ 2 สัปดาห์ ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอน โดยทำการนับจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัส และเจริญเป็นต้นได้ ซึ่งใบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมนั้นจะสามารถเจริญไปเป็นแคลลัสในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินได้ ส่วนใบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนจะไม่สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ ซึ่งจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ คือ 48 ใบ จากจำนวนใบทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง 50 ใบ คิดเป็นประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน 96 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นทำการคัดเลือกยอดที่เกิดจากแคลลัส โดยทำการคัดเลือกยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ มีใบสีเขียวเข้มและใบแผ่ ดังรูปที่ 4.7(ก) ซึ่งคาดว่าเป็นยอดที่พัฒนามาจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน เลี้ยงในอาหาร MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และยาปฏิชีวนะคาเบนนิซิลินเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนจะมีลักษณะไม่สมบูรณ์ คือ ลำต้นและใบสี ใบลิบเล็ก ดังรูปที่ 4.7(ข)



(ก)

(ข)

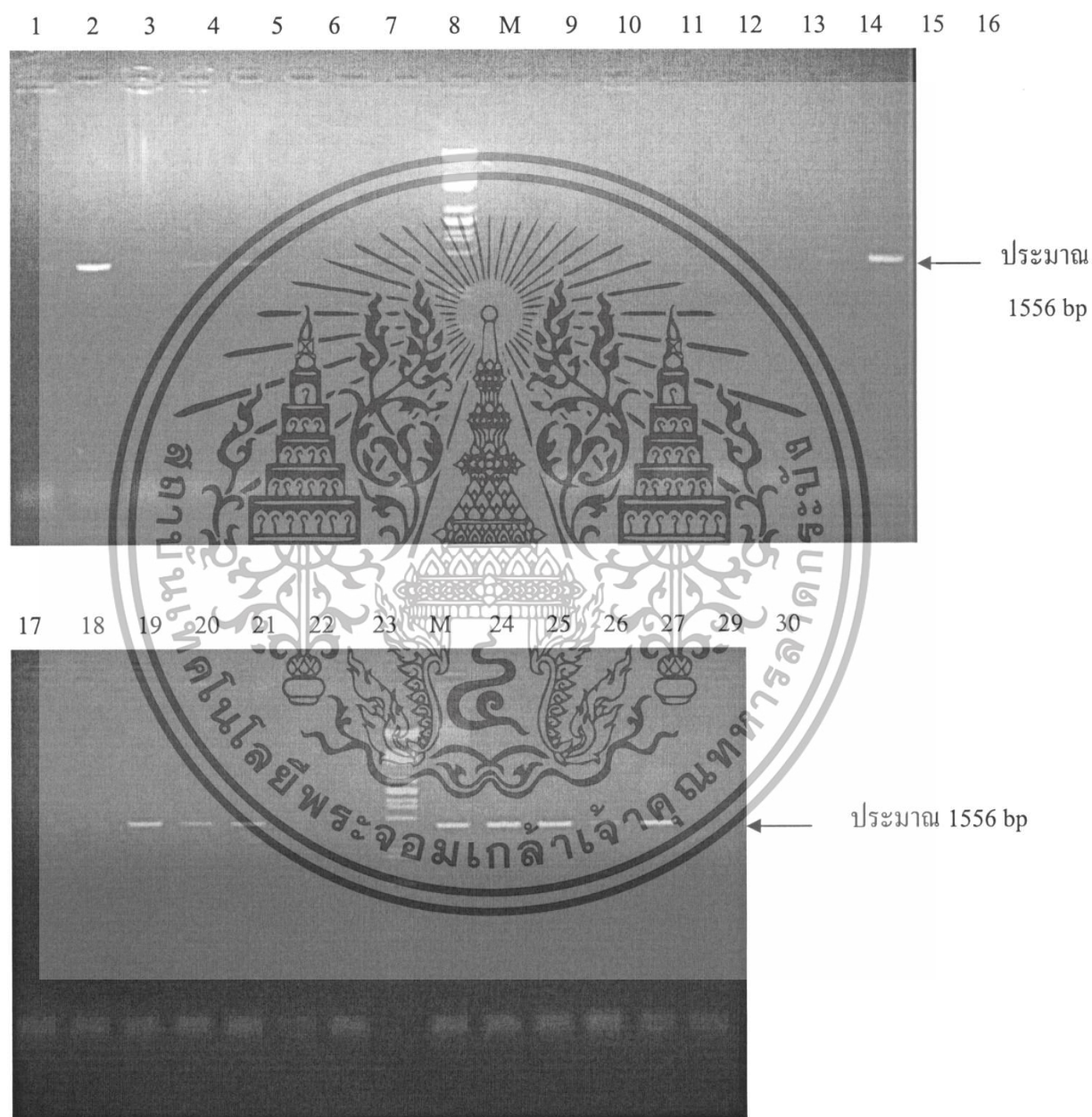
รูปที่ 4.7 ยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายโอนยีน *TT8* (ก) คือ ภาพของยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ใบลักษณะสีเขียวเข้มและใบแผ่ (ข) คือ ภาพของยอดที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ ใบมีลักษณะลิบเล็กและค่อนข้างใส

4.3.2 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่คัดเลือกได้และตรวจสอบหา ยีนที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *TT8* เมื่อทำการพีซีอาร์แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์

พบว่าต้นยาสูบหมายเลข 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27 และ 29 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน *778* แทรกอยู่ เนื่องจากปรากฏแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1556 คู่เบส ในขณะที่การพีซีอาร์ดีเอ็นเอจากต้นยาสูบหมายเลข 3, 6, 9, 11, 14, 17, 22, 23 และ 30 ไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอ เนื่องจากไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ผลจากการทำพีซีอาร์ของสารสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-30 คือ หมายเลขของต้นยาสูบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

นำพืชทดลอง (ต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์และอายุใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงต่างๆ ได้แก่ แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์) หลอดแบล็คไลท์ และหลอดโกลด์ลักซ์ (ความเข้มแสง 500 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสง การเกิดลิปิโดเปอร์ออกซิเดชัน และปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

4.4.1 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

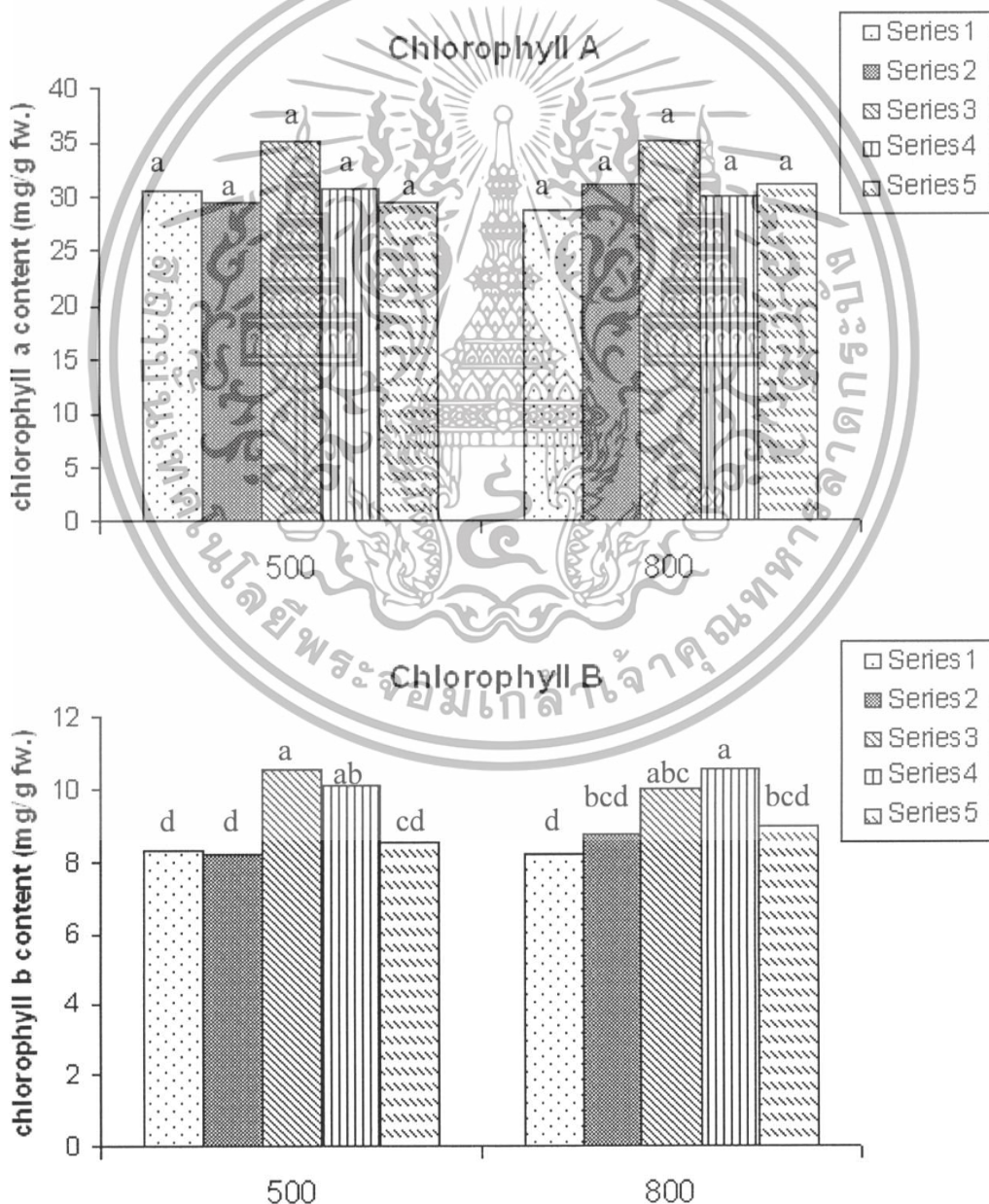
การเจริญเติบโตของต้นยาสูบทดลองภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันโดยมีลำต้นยืดยาวขึ้น ใบด้านล่างของต้นมีสีเหลืองซีดที่ขอบใบ เฉลี่ยต้นละ 1-2 ใบ ส่วนยอดมีสีเขียวเข้ม ดังรูปที่ 4.9(ก) ในขณะที่ต้นยาสูบชุดควบคุม คือ ต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ มีลักษณะลำต้นและใบเป็นสีเขียวเข้ม ลำต้นมีการยืดยาวขึ้น ดังรูปที่ 4.9(ข)



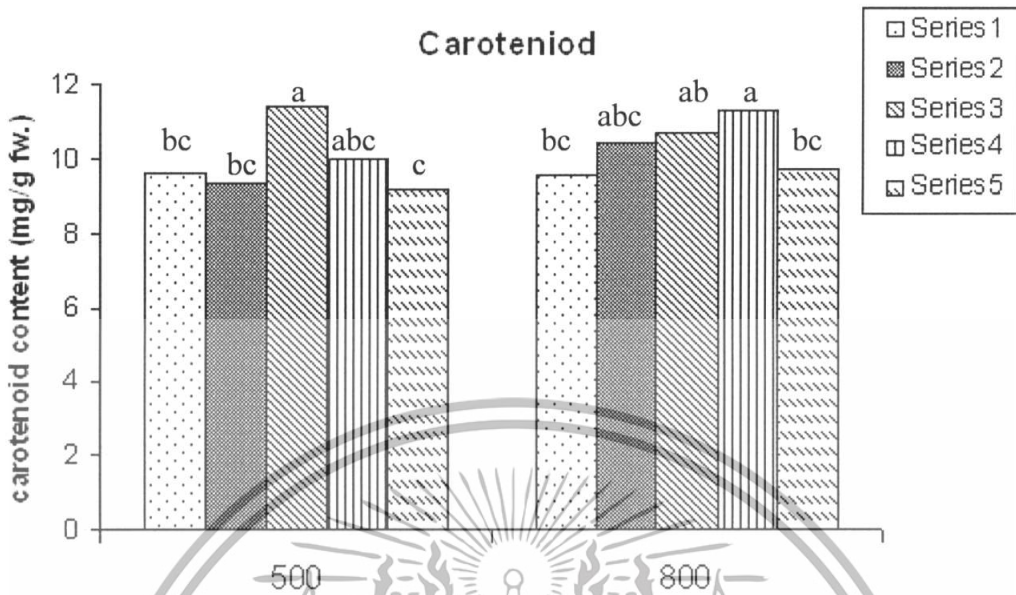
รูปที่ 4.9 ต้นยาสูบทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นพืชทดลอง โดยศึกษาจากปริมาณการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงซึ่งได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณรงควัตถุชนิดต่างๆ ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ของต้นยาสูบทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้ง 2 ชนิดและแคโรทีนอยด์ ของต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ (ชุดควบคุม) ดังรูปที่ 4.10

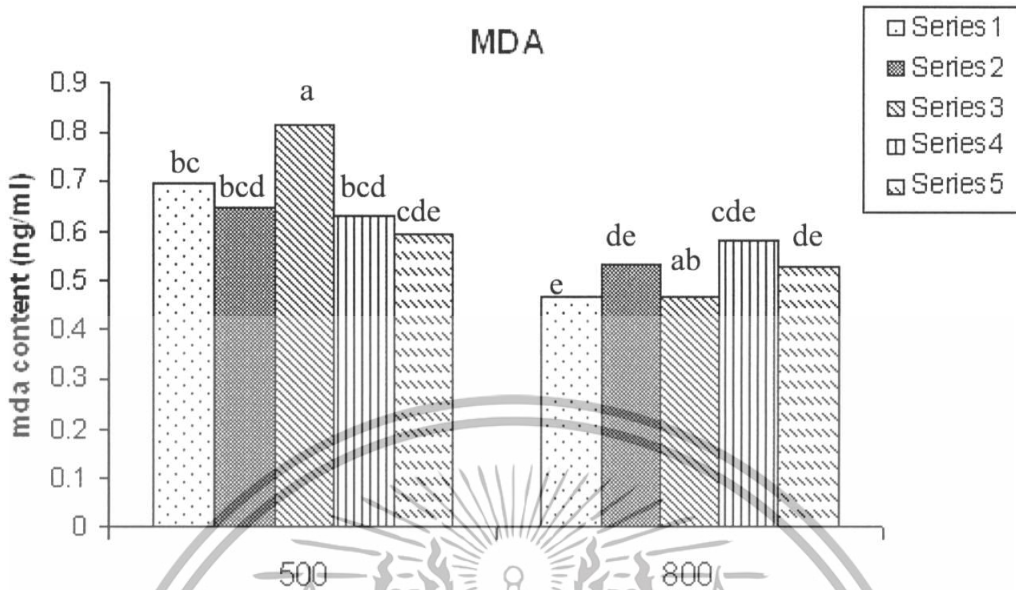


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



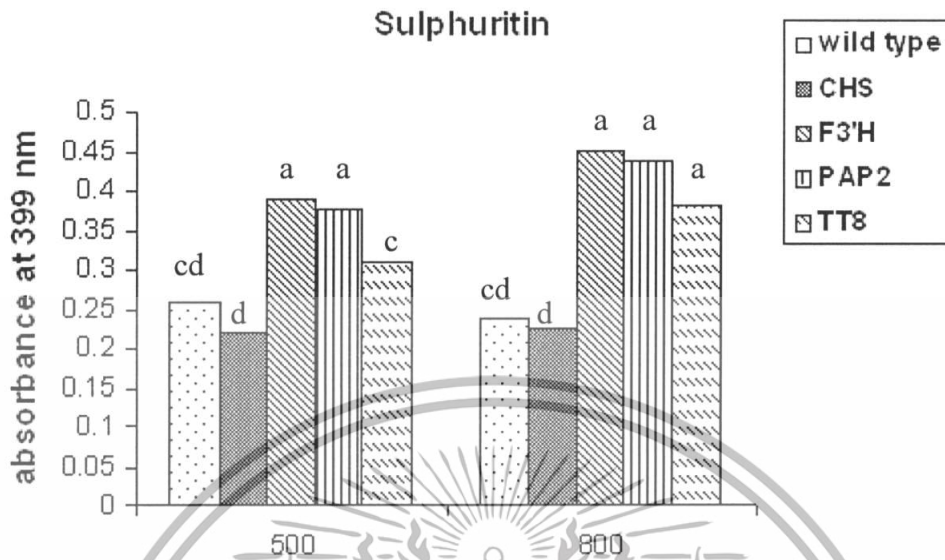
รูปที่ 4.10 ปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสงในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีโนมของพืชสังเคราะห์แสง (CHS, F3'H, PAP2 และ TT8) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

การเกิดลิปดเปอร์ออกซิเดชันหวได้จากปริมาณสารมาลอนไดไฮดริล (เอ็มดีเอ) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในกระบวนการของลิปดเปอร์ออกซิเดชัน เมื่อทำการหาปริมาณเอ็มดีเอในต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 800 ลักซ์ แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณเอ็มดีเอจากต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 500 ลักซ์ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมพบว่าต้นยาสูบทุกสายพันธุ์มีปริมาณเอ็มดีเอลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นสายพันธุ์ปกติมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.11 ซึ่งคาดว่าสภาพความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นไม่มากพอที่จะมีผลให้เกิดสภาวะเครียด แต่ยังคงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง



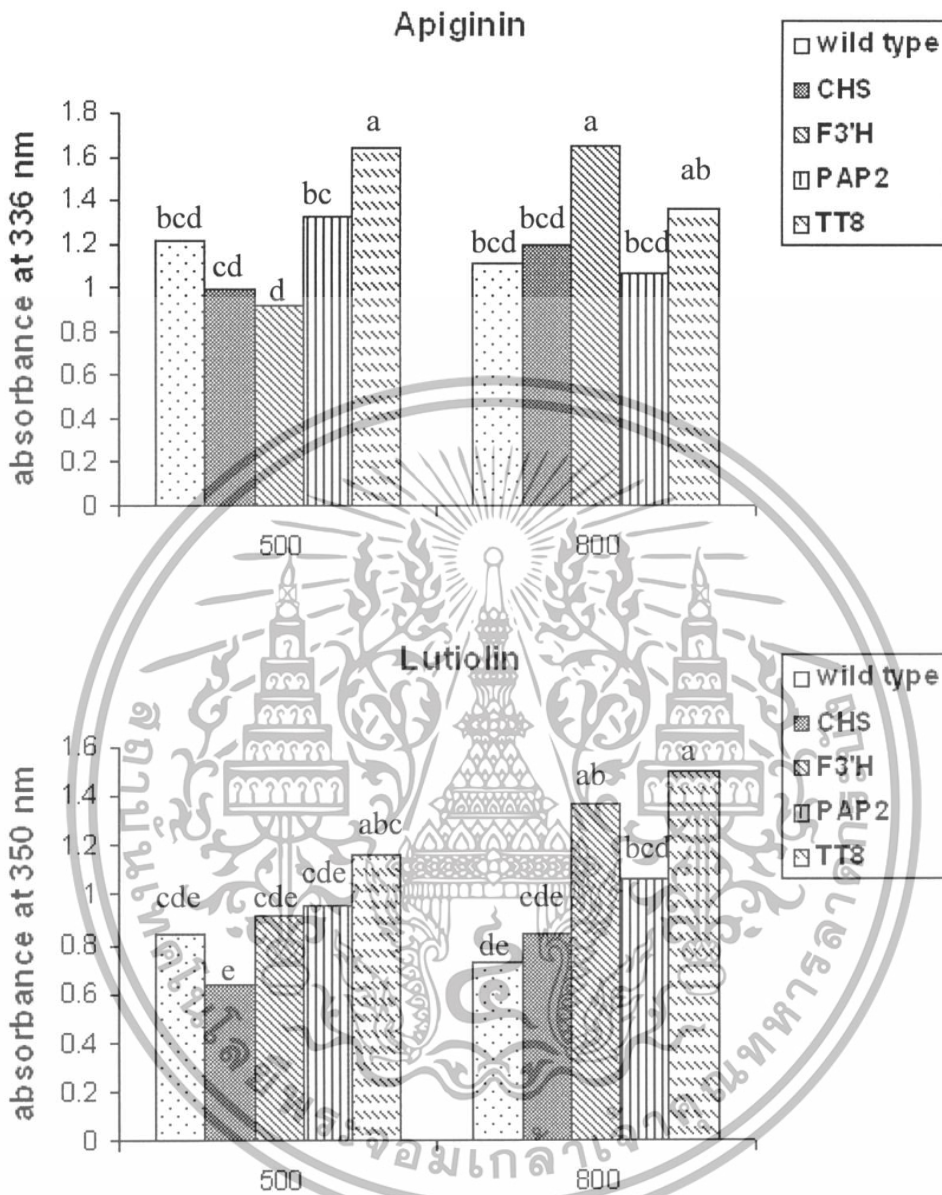
รูปที่ 4.11 ปริมาณของเอ็มดีเอในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีโนมของพืชเฟลไวโนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรดินซึ่งเป็นสารในกลุ่มออโรน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของต้นยาสูบปกติมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย ขณะที่ต้น *CHS* และ *F3'H* เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบ *PAP2* และ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มออโรน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรตินที่ 399 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทิโอลินของต้นยาสูบสายพันธุ์ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สายพันธุ์ *CHS*, *PAP2* และ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบปกติมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารอะพิจินินในต้นยาสูบสายพันธุ์ *F3'H* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สายพันธุ์ปกติ *PAP2* และ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย และสายพันธุ์ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่การเพิ่มขึ้นและลดลงนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีโนมของพืชเฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตรและอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

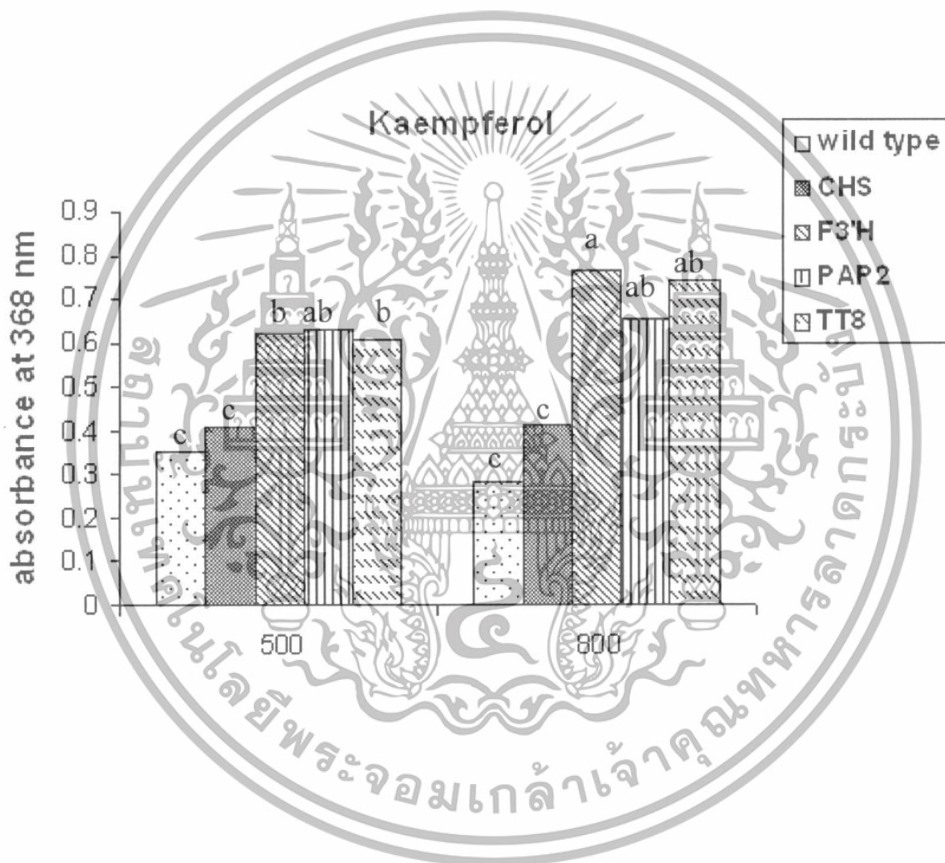
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวาโนน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเฮสเพอริดินของต้นยาสูบสายพันธุ์ $F3'H$ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นสายพันธุ์ปกติที่มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารนาริจินินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ปกติที่มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย แต่การเพิ่มและลดลงนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.14

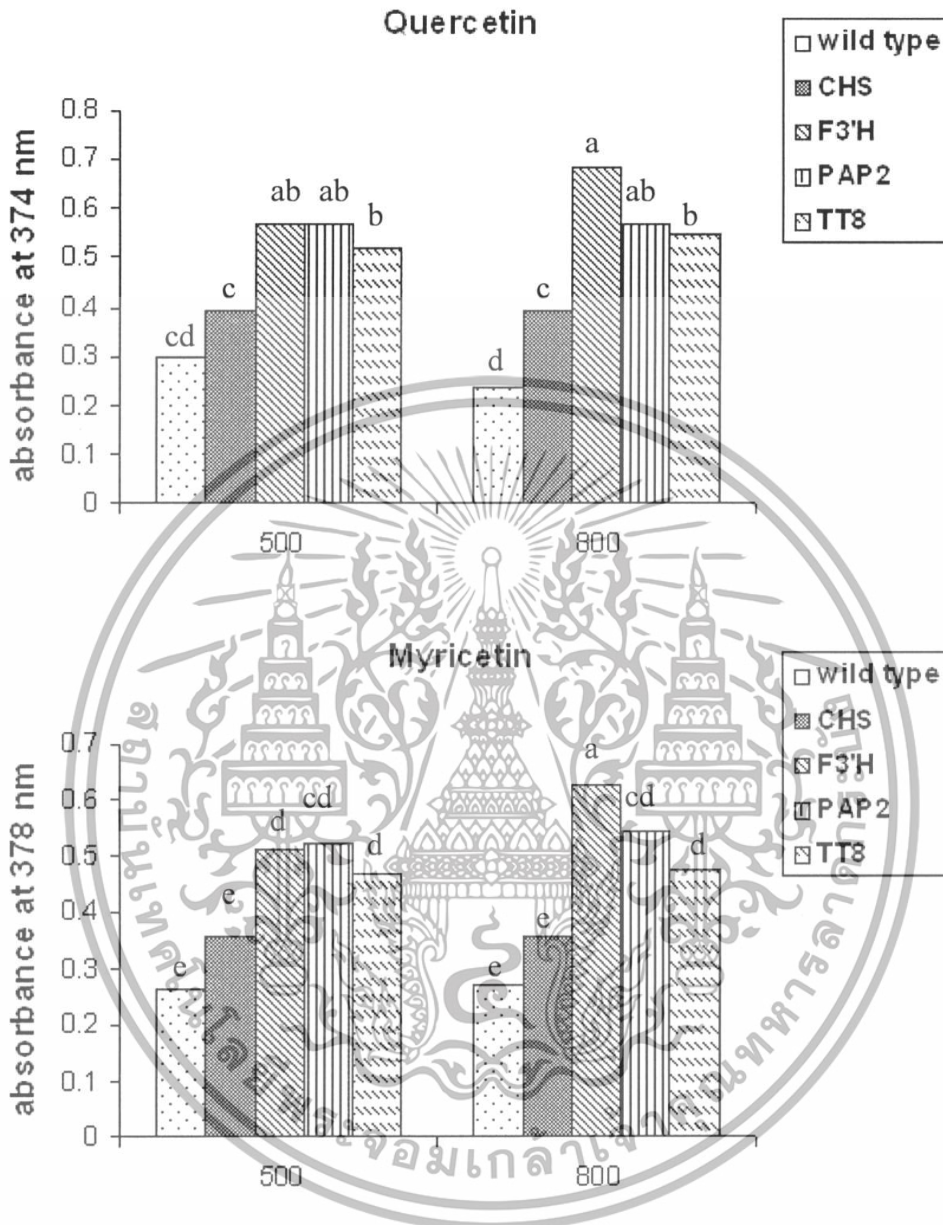


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ, *CHS*, *PAP2* และ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารไมริเซติน สารเคเอ็มพีรอลและเคอร์เซตินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารไมริเซตินและเคเอ็มพีรอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.15



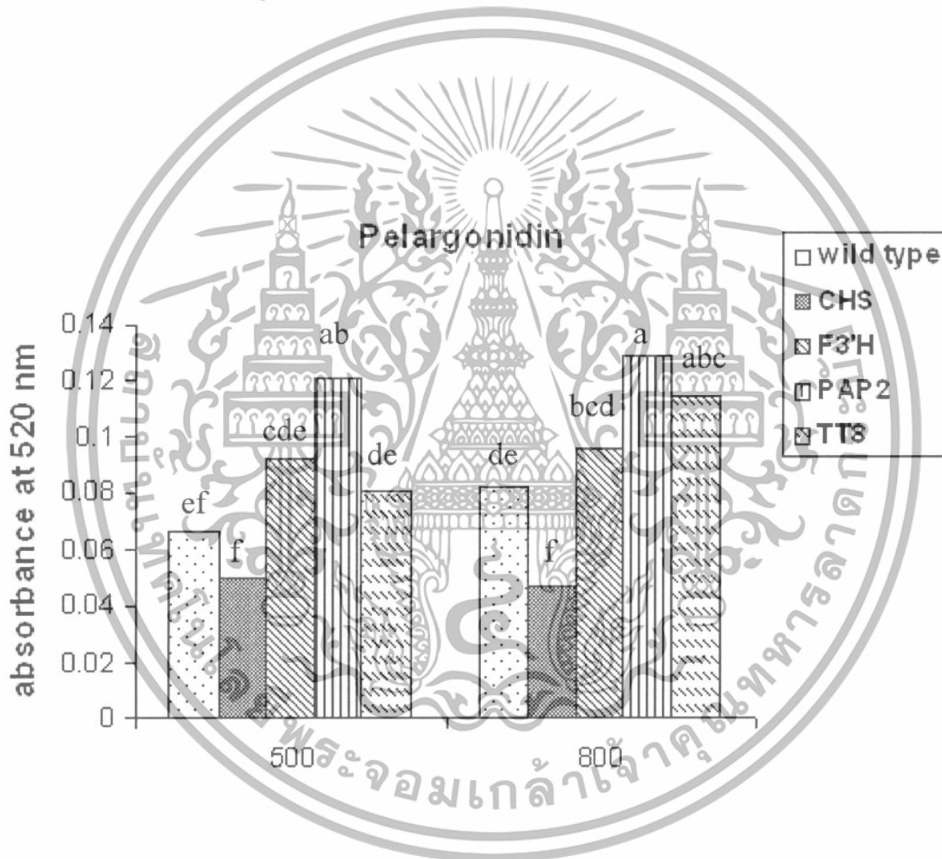
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



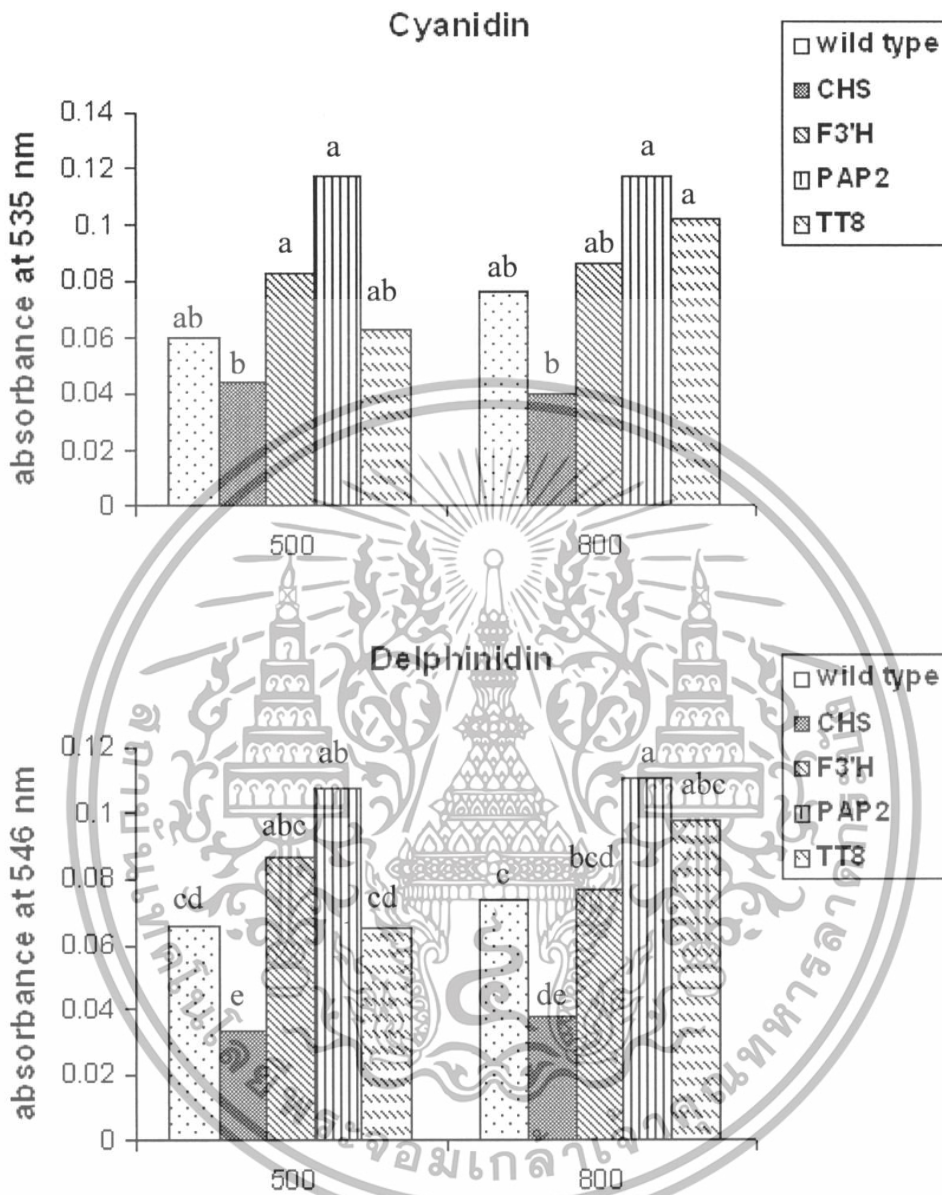
รูปที่ 4.15 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีโนมของพืชเฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร, สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และ ไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตรค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่าสารเพลาโกนินิดินในต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบสายพันธุ์ *CHS*, *F3'H* และ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบปกติ, *CHS*, *PAP2* และ *TT8* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 800 ลักซ์ มีสารเคลฟิโนนิดินและไซยานินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ขณะต้นยาสูบ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อยอย่างไม่มีความต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.16



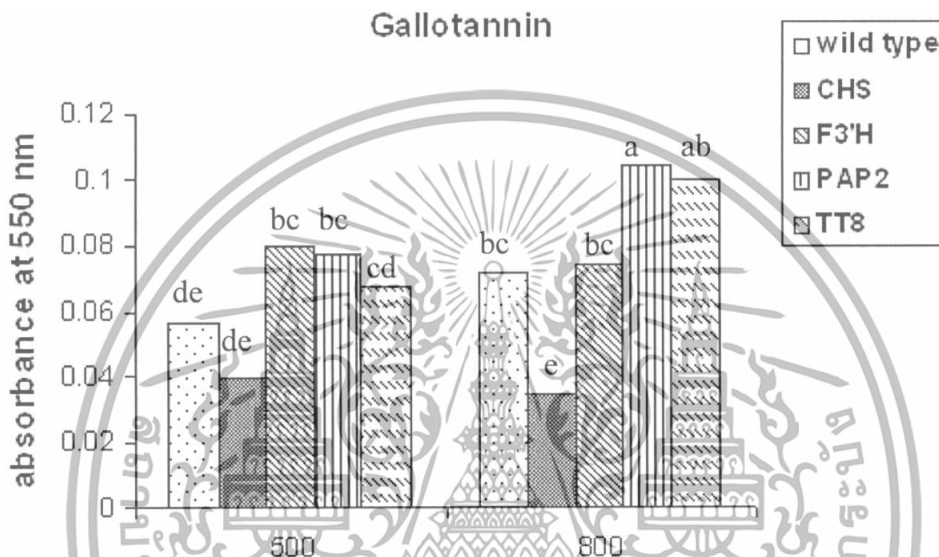
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีวสังเคราะห์เพลวโนยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเดลฟินิดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนิน 520 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

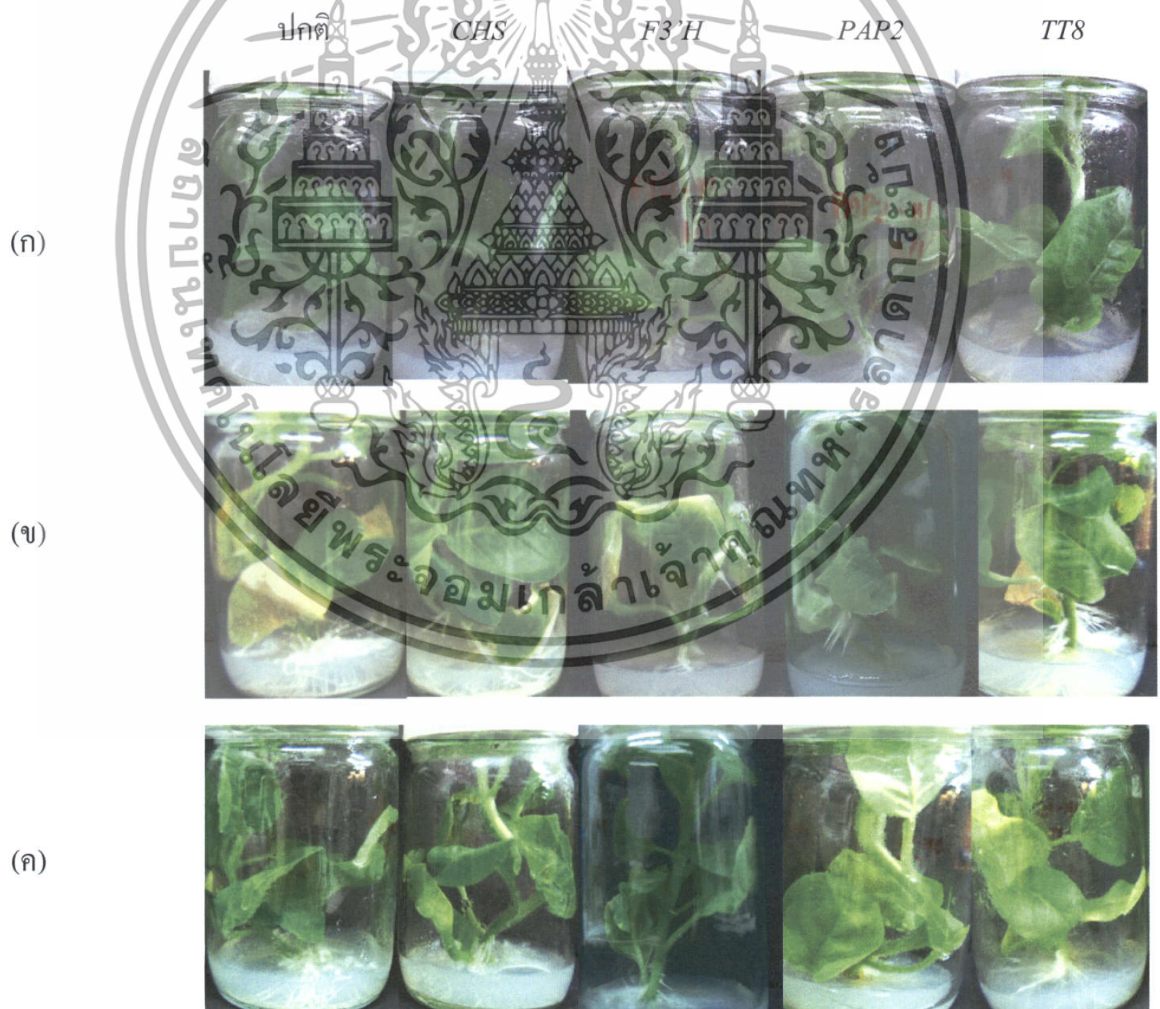
การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารแกดโลแทนนิน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบ *CHS* และ *F3'H* ลดลงเล็กน้อยอย่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ, *PAP2* และ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารแกดโลแทนนิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในพืชสังเคราะห์ไฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 และ 800 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารแกดโลแทนนินที่ 546 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

4.4.2 ผลของชนิดแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

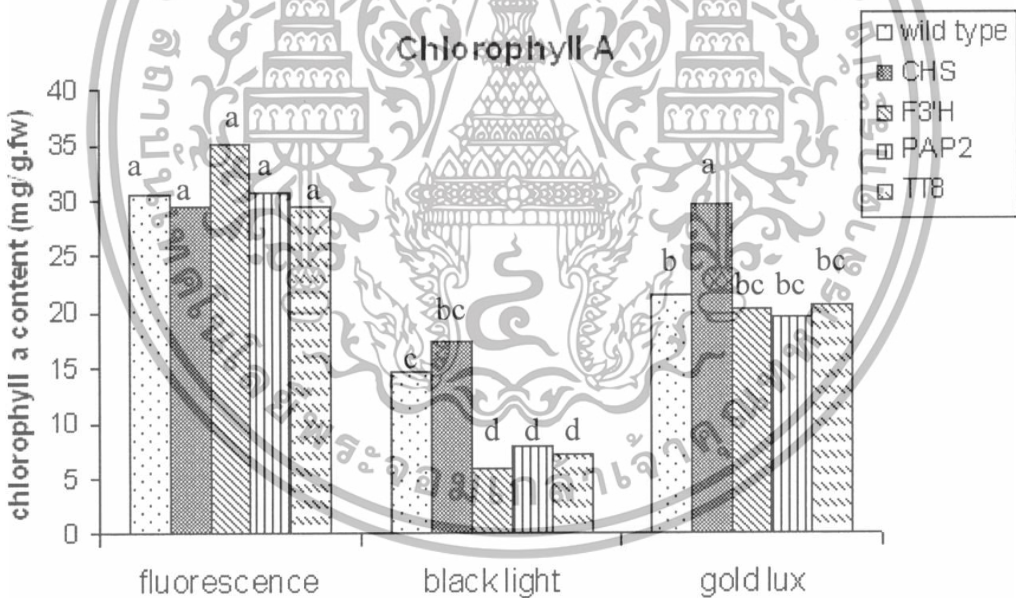
การตรวจสอบการเจริญเติบโตของต้นยาสูบทดลอง ที่เลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ หลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงภายใต้หลอดแบล็คไลท์ทุกสายพันธุ์มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ ลำต้นมีการยืดสูงขึ้น มีใบที่มีลักษณะขอบใบเหี่ยวและมีสีเหลืองซีดเฉลี่ยต้นละ 3-4 ใบ แต่ปลายยอดมีสีเขียวเข้ม ยกเว้นต้นสายพันธุ์ปกติกจะมีสีเหลืองซีดเกือบทั้งต้น ดังรูปที่ 4.18(ข) ในขณะที่ต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดโกลด์ลักซ์มีลักษณะใกล้เคียงกันเช่นกัน คือลำต้นมีการยืดสูงขึ้น แต่สายพันธุ์ *CHS*, *PAP2* และ *TT8* มีใบเฉลี่ย 1-2 ใบที่มีสีเหลืองซีดที่ขอบใบ แต่ทุกสายพันธุ์มียอดสีเขียวเข้ม ดังรูปที่ 4.18(ค) เปรียบเทียบกับต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 18(ก)



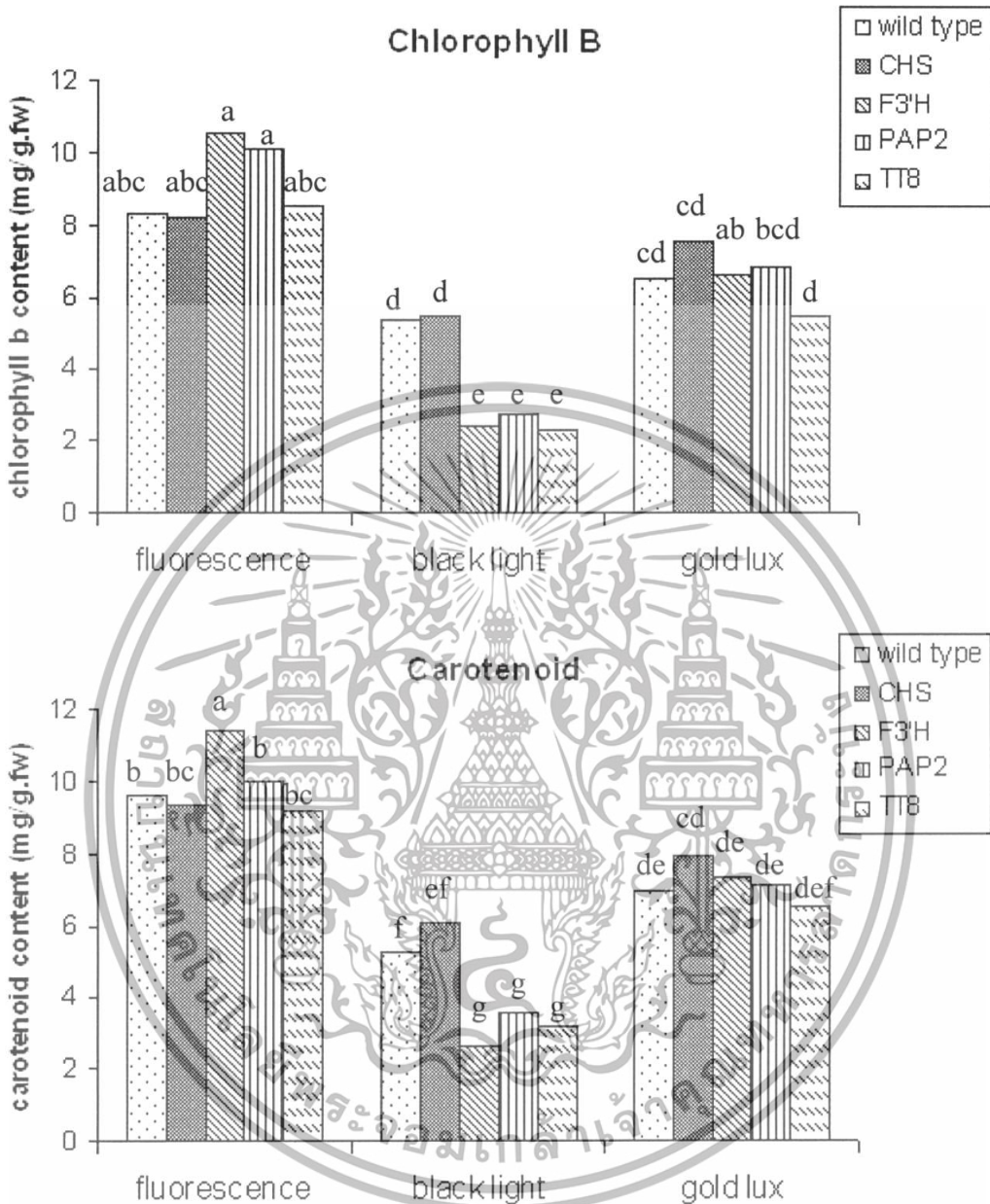
รูปที่ 4.18 ต้นยาสูบทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ หลอดเอกสารนี้เป็นเอกสารแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่มีความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสง การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในต้นพืชทดลองที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และโกลด์ไลท์ กับปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสง การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในต้นพืชทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ของต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ในขณะที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดโกลด์ไลท์นั้น ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ยกเว้นสายพันธุ์ *CHS* ที่มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ของต้นยาสูบสายพันธุ์ *PAP2* และ *TT8* มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ มีปริมาณลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.19



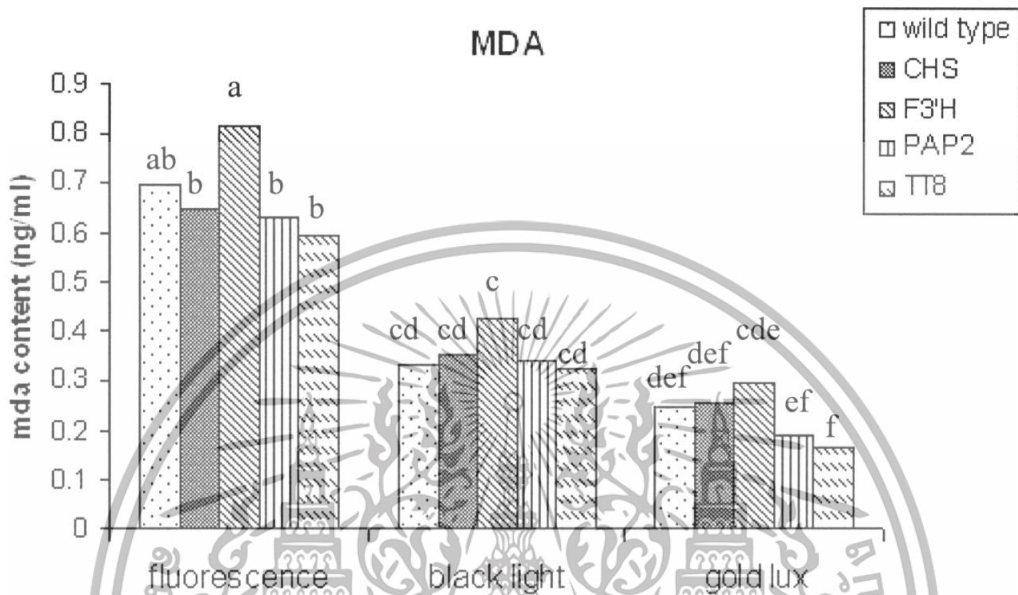
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 ปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสงในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีโนมของพืชเฟลวอนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ หลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

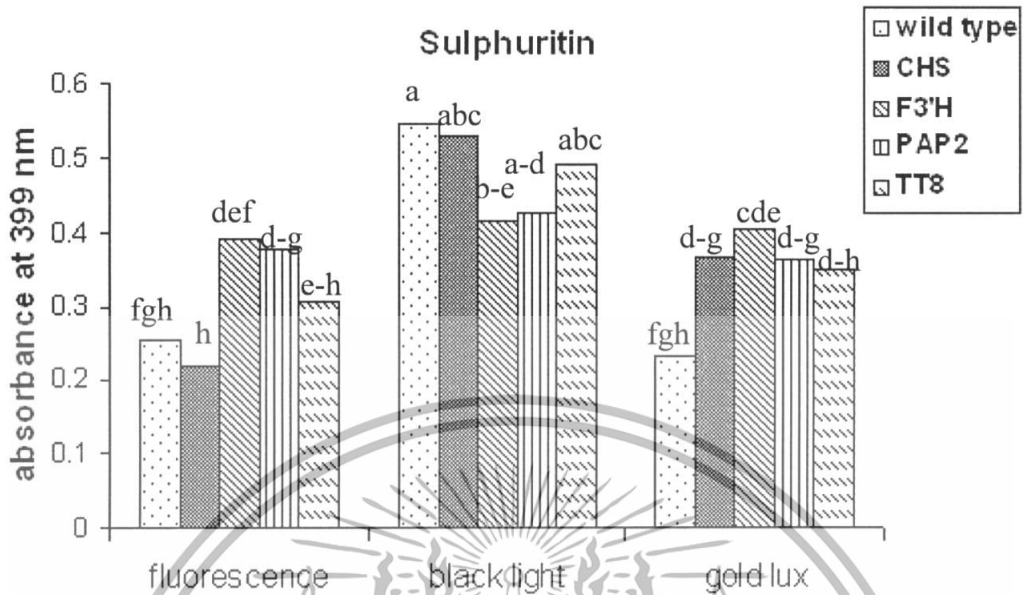
ปริมาณเอ็มดีเอของต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงได้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ และหลอดโกลด์ลักซ์มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับหลอดฟลูออเรสเซนต์ อย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 ปริมาณของเอ็มดีเอในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในยีนสังเคราะห์ฟีลโรนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ หลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจกจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

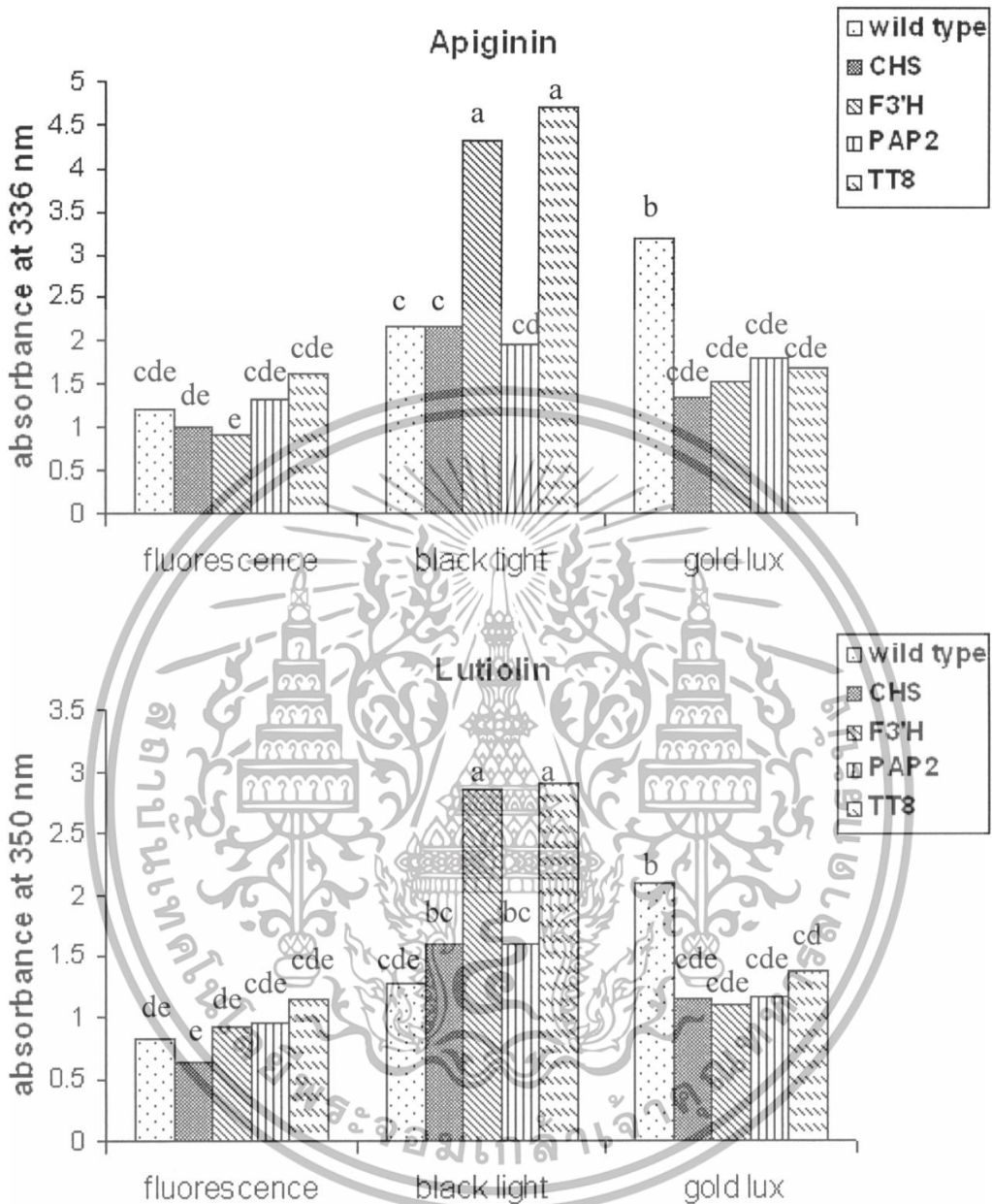
การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรติน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของต้นยาสูบปกติ *CHS*, *F3'H* และ *TT8* ที่เพาะเลี้ยงได้แสงจากหลอดแบล็คไลท์มีค่าการดูดแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ต้น *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบทดลองทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงได้แสงโกลด์ลักซ์มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นต้น *CHS* ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 4.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มออโรโน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีวสังเคราะห์เพลโดโนยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ หลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่มีความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรตินที่ 399 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเพลโดโน พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ *CHS*, *F3'H* และ *TT8* ที่เลี้ยงใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ มีค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทิโอลินและอะพิจินินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบปกติ และ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารทั้ง 2 ชนิดนี้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเพลโดโนทั้ง 2 ชนิดในต้นยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงใต้แสงโกลด์ลักซ์ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.22



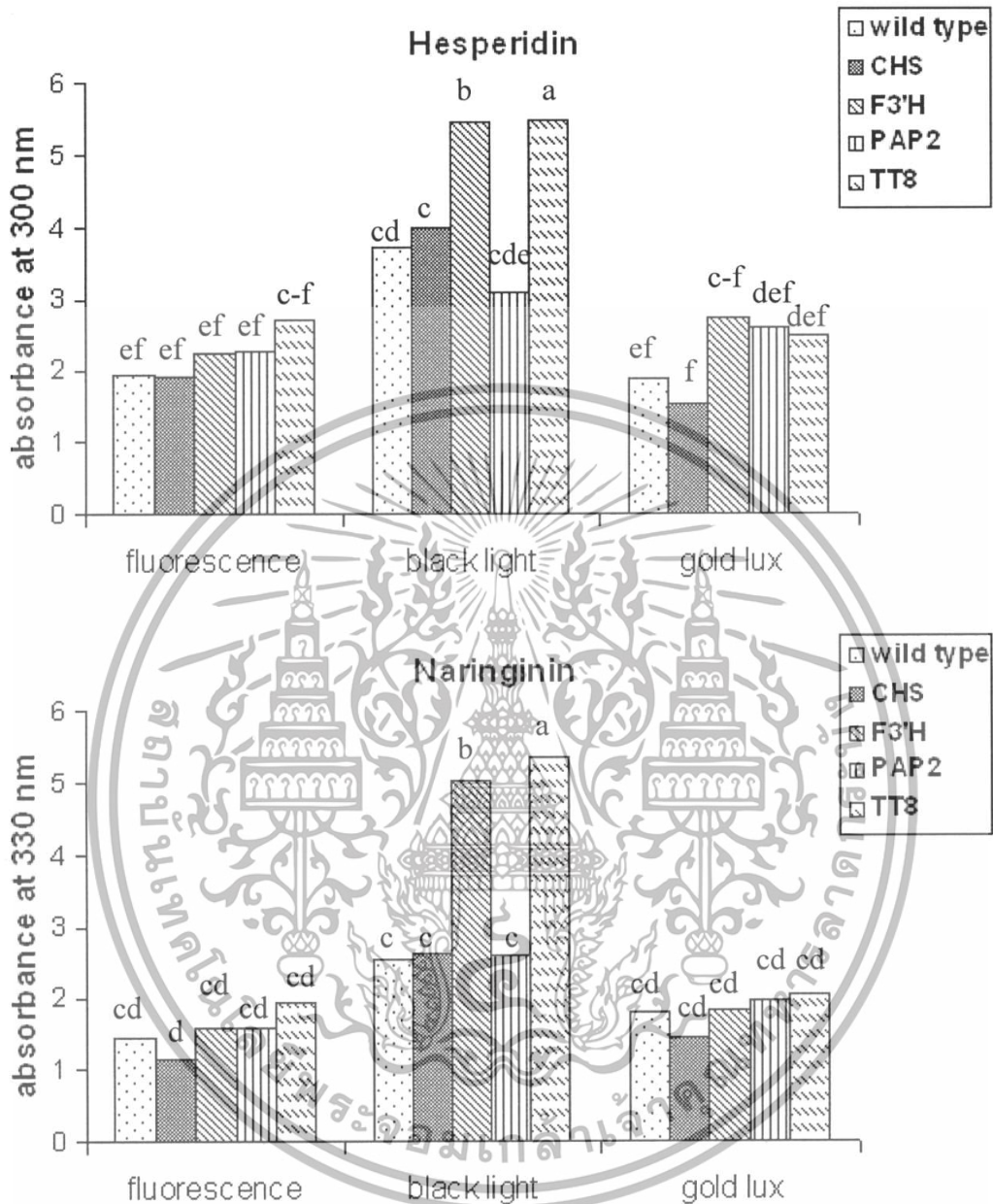
รูปที่ 4.22 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตร และอะพิจินินที่ 336 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวาโนน พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ, *CHS*, *F3'H* และ *TT8* ที่เลี้ยงได้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ มีค่าการดูดกลืนแสงของสารเฮสเพอริดินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารเฮสเพอริดินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารนี้ในต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงได้แสงโกลลักษ์ พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารนาริจินิน พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ *TT8*, *F3'H* และ *CHS* ที่เลี้ยงได้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สายพันธุ์อื่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงในต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้แสงโกลลักษ์มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.23



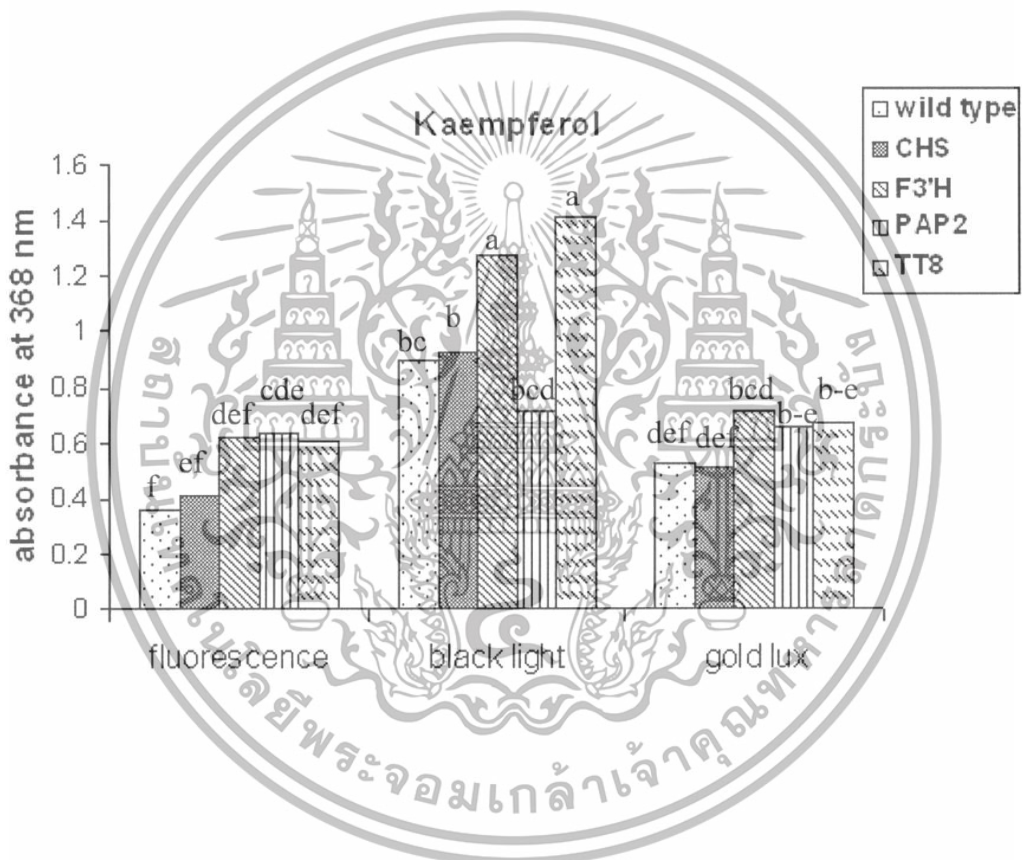
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



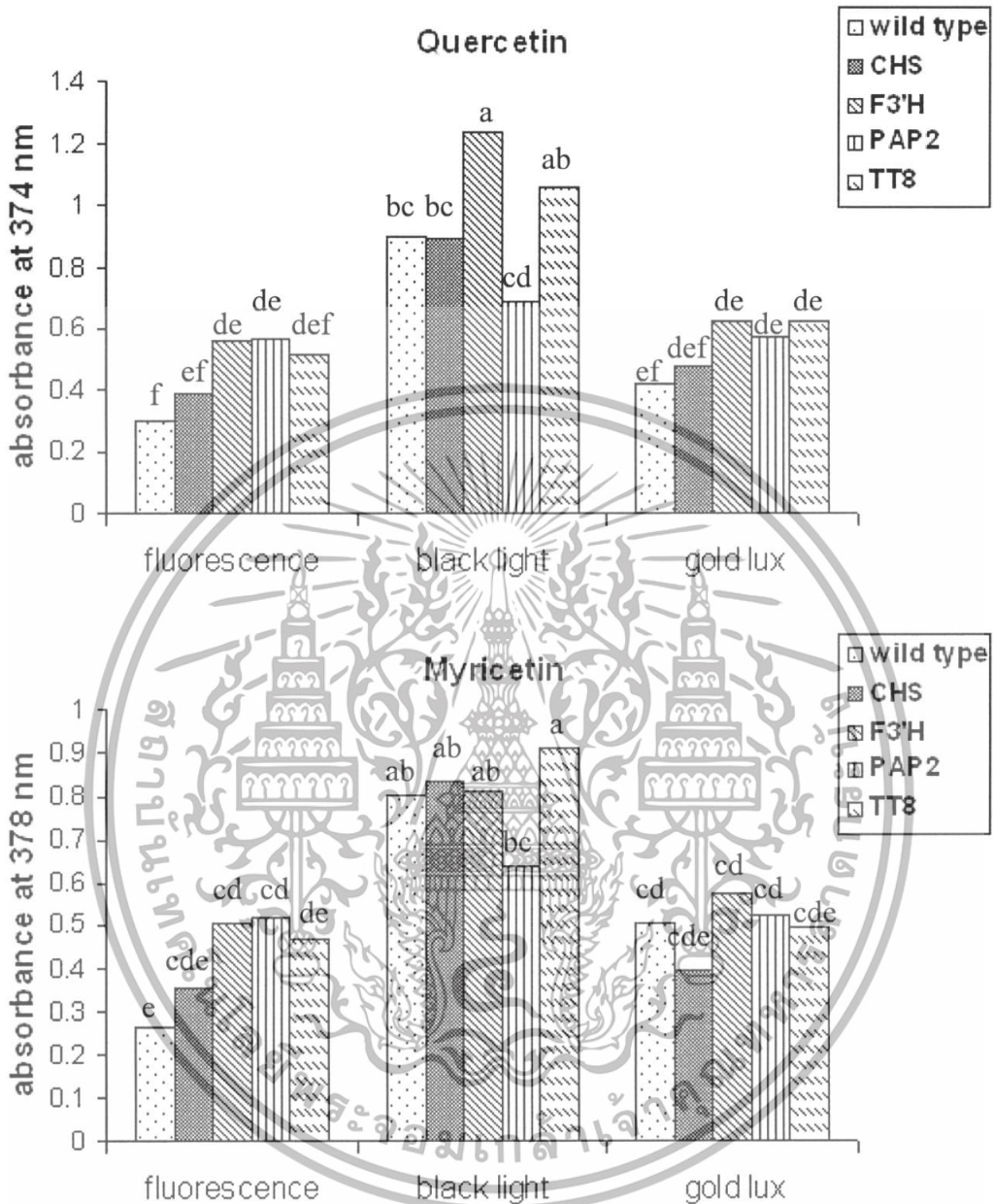
รูปที่ 4.23 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอนในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในจีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเฮสเพอริดินที่ 300 นาโนเมตรและนาริงินินที่ 330 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ, *CHS*, *F3'H* และ *TT8* ที่เลี้ยงใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ มีค่าการดูดกลืนแสงของสารไมริเซติน เคเอ็มพีรอลและเคออร์เซติน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงของสารทั้ง 3 ชนิดนี้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิดในต้นยาสูบทดลองทุกสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงใต้แสงโกลด์ลักซ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นสารไมริเซตินในต้นยาสูบปกติ มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.24



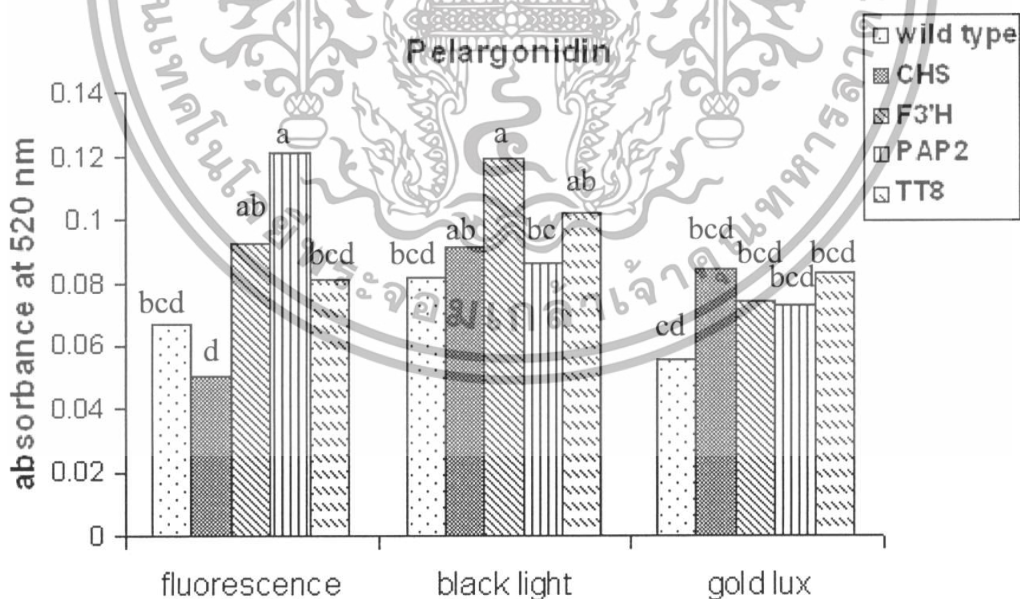
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



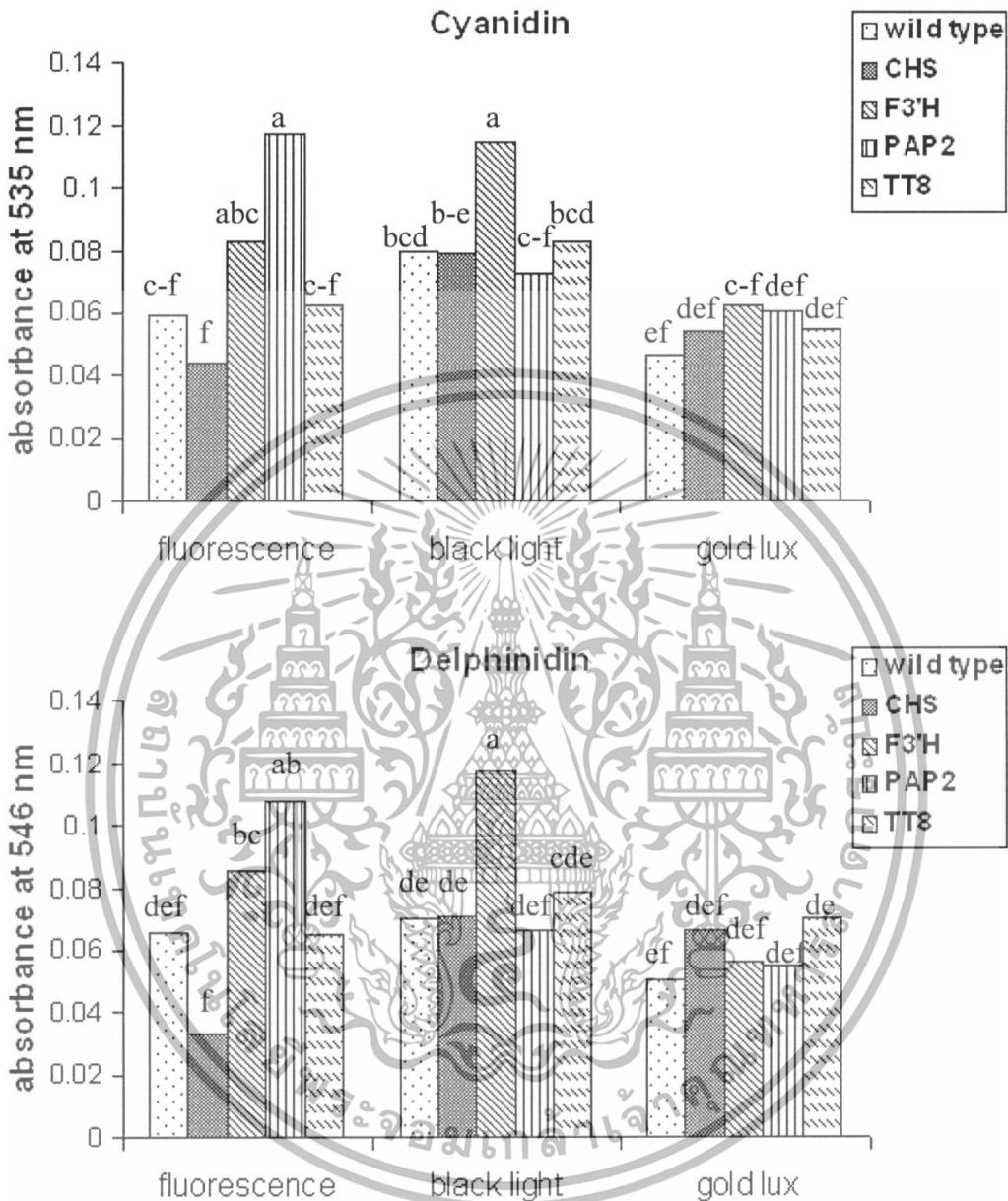
รูปที่ 4.24 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ไลท์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารไมริเซตินที่ 378 นาโนเมตร สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร และเคอร์เซตินที่ 374 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารเพลาโกนินและไซยานินในต้นยาสูบสายพันธุ์ *PAP2* มีค่าลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ ส่วนต้นยาสูบ *CHS* มีค่าเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ในต้นยาสูบสายพันธุ์อื่นมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ค่าการดูดกลืนแสงของสารเพลาโกนินและไซยานินในต้นยาสูบที่เลี้ยงใต้แสงจากหลอดโกลด์ลักซ์ พบว่าสายพันธุ์ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสายพันธุ์อื่นมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นสายพันธุ์ *CHS* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเตลฟิโนนินของต้นยาสูบทดลองที่เลี้ยงใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์ พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ *CHS* และ *F3'H* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบ *PAP2* มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนต้นยาสูบปกติมีค่าลดลงและ *TT8* มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบทดลองที่เลี้ยงใต้แสงจากหลอดโกลด์ลักซ์ให้ค่าการดูดกลืนแสงของต้นยาสูบ *F3'H* และ *PAP2* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบสายพันธุ์ *CHS* และ *TT8* มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนต้นยาสูบปกติมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.25



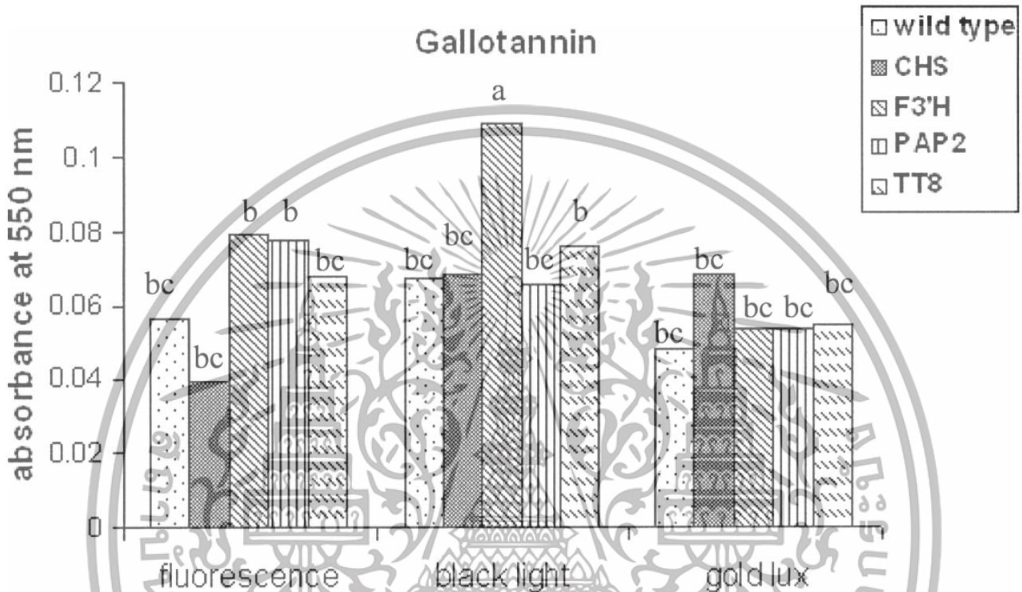
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารเดลฟินิดินที่ 546 นาโนเมตร, สารไซยานิดินที่ 535 นาโนเมตร และ สารเพลาโกนิน 520 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารแกลโลแทนนินของต้น *F3'H* ที่เลี้ยงใต้แสงแบล็คไลท์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสายพันธุ์ปกติ, *CHS* และ *TT8* มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นและ *PAP2* มีค่าลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนต้นยาสูบทดลองที่เลี้ยงใต้หลอดโกลด์ลักซ์มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นสายพันธุ์ *CHS* ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารแกลโลแทนนิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ (wild type) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (*CHS*, *F3'H*, *PAP2* และ *TT8*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และหลอดโกลด์ลักซ์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์เป็นเวลา 7 วัน ค่าการดูดกลืนแสงของสารแกลโลแทนนินที่ 546 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในต้นยาสูบทดลองนั้น พบว่าชนิดของแสงมีผลต่อการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์มากกว่าความเข้มแสง โดยแสงจากหลอดแบล็คไลท์นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเฟลโวนอยด์และคลอโรฟิลล์มากที่สุด เนื่องจากหลอดแบล็คไลท์ให้แสงที่มีความยาวคลื่นใกล้เคียงกับรังสียูวี-เอ คืออยู่ในช่วงประมาณ 360-375 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถรับพลังงานแสงได้หมด และมีพลังงานสูงกว่าแสงสีขาวทั่วไป จึงอาจมีกลไกกระตุ้นให้ต้นพืชชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ที่อยู่ในบริเวณต้นชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ โดยเฉพาะซัลฟูเรติน สารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ฟลาโวนอน และเอกสารนเป็นเอกสารถงวนไวสำหรับการศึกษาเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟลไวโนล เพื่อช่วยในการรับแสงในช่วงที่คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ไม่สามารถรับได้ จึงน่าจะเป็นการช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระในปริมาณที่ต่ำจะช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช แต่ถ้ามีปริมาณที่มากเกินไปอาจมีผลในการทำลายโครงสร้างและระบบต่างๆ ในเซลล์พืช จึงมีผลให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน จากการทดลองนี้พบว่าสารกลุ่มเฟลไวโนล เฟลวาโนน และเฟลไวโน มีปริมาณเพิ่มขึ้นในต้นยาสูบทดลองทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ PAP2 ปริมาณเฟลไวโนอยด์ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลต่อการลดลงของเอมดีเอ ในขณะที่แสงจากหลอดโกลดักซ์ให้แสงสีแดงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 600-700 นาโนเมตรนั้น เป็นช่วงของคลื่นแสงที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสง เนื่องจากคลอโรฟิลล์สามารถดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 420 และ 660 นาโนเมตรได้ดี จึงเป็นผลให้ปริมาณสารกลุ่มเฟลไวโนอยด์ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และมีการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันน้อยกว่าการทดลองกลุ่มอื่นๆ

จากผลการทดลองวัดปริมาณเอมดีเอ จากต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์พบว่าปริมาณสูงสุดนั้น อาจเนื่องมาจากแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์นั้นนอกจากจะให้แถบสเปกตรัมแสงขาวแล้วยังมีส่วนที่ไม่ต่อเนื่อง โดยเส้นที่เห็นเด่นชัดคือสีเขียว ซึ่งเกิดจากราตุที่บรรจุไว้ในหลอด โดยแสงสีเขียวจะความยาวคลื่นในช่วงประมาณ 500-550 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถรับแสงได้ จึงเป็นผลให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันสูงกว่าแสงจากหลอดโกลดักซ์ที่มีช่วงแสงที่เหมาะสมกว่า และหลอดแบล็คไลท์ที่มีการสะสมของสารกลุ่มเฟลไวโนอยด์สูงกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเฟลไวโนอยด์กลุ่มต่างๆในต้นยาสูบ ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมีปริมาณโดยเฉลี่ยสูงกว่าในต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ จึงสรุปได้ว่าความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นจาก 500 เป็น 800 ลักซ์ และความยาวคลื่นจากแหล่งแสงที่แตกต่างกัน มีผลต่อการผลิตกลุ่มเฟลไวโนอยด์ และต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลไวโนอยด์ มีการแสดงออกของยีนในการกระตุ้นการสังเคราะห์เฟลไวโนอยด์ได้มากกว่าสายพันธุ์ปกติ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 การโคลนยีน

จากการนำยีน *TT8* ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอยีน *TT8* ออกมา ทำการเชื่อมต่อยีน *TT8* เข้ากับเวกเตอร์ pBI121 แล้วทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด พบว่าได้โคลนของ *E. coli* ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน ได้จำนวน 8 โคลนซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน นำโคลนที่ได้มาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบการแทรกของยีนดีเอ็นเอ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าโคลนหมายเลข 8 ได้รับเวกเตอร์ที่มียีน *TT8* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทิศทางการแสดงออกของ โปรโมเตอร์ 35S

5.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโครแบคทีเรีย

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน *TT8* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทิศทางเข้าสู่เชื้ออะโครแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA 4404 พบว่าได้โคลนของเชื้ออะโครแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินจำนวน 4 โคลน ซึ่งคาดว่าเป็นโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน เมื่อทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบการถ่ายโอนยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับส่วน 35S promoter บนพลาสมิด pBI121 พบว่าโคลนหมายเลข 4 ได้รับพลาสมิดที่มีบริเวณ โปรโมเตอร์ 35S ที่ต่ออยู่กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *TT8*

5.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้เชื้ออะโครแบคทีเรีย

การศึกษาการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน *TT8* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทิศทางแสดงออกของ โปรโมเตอร์ 35S เข้าสู่ชิ้นส่วนใบของต้นยาสูบ โดยใช้เชื้ออะโครแบคทีเรีย เมื่อนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรชักนำแคลลัสที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ 48 ใบ จากจำนวนที่ใช้ในการทดลอง 50 ใบ คิดเป็นประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน 96 เปอร์เซ็นต์

ทำการคัดเลือกยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์จากแคลลัส แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน จากนั้นทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ได้จำนวน 30 ต้น และตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ ด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบและทำเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *TT8* พบว่าต้นหมายเลข 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 24, 26, 27 และ 29 ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT8*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

5.4.1 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาโดยดูจากปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงและศึกษาปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์และปริมาณเอเอ็มดีเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด โดยวัดปริมาณสารต่างๆในต้นพืชทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ เปรียบเทียบกับปริมาณสารต่างๆในต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ พบว่า ต้นยาสูบปกติมีการผลิตสารกลูโคโลแทนนิน (กลุ่มแทนนิน) เพิ่มเพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น ต้นยาสูบสายพันธุ์ *TT8* สามารถผลิตสารเพลาโกนินดิน และซัลฟูเรติน ได้เพิ่มขึ้น ส่วนต้นยาสูบสายพันธุ์ *F3'H* มีการผลิตสารกลุ่มเฟลโวน, กลูโคโลแทนนินและสารบางตัวในกลุ่มเฟลโวนอล (ไมริเซตินและเคเอ็มพีรอล) และกลุ่มเฟลวาโนน (เฮสเพอริดิน) ได้เพิ่มมากขึ้น สายพันธุ์ *PAP2* มีการผลิตสารกลูโคโลแทนนินและซัลฟูเรตินเพิ่มขึ้น ขณะที่ต้นสายพันธุ์ *CHS* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญทางสถิติเกิดขึ้น ส่วนปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ของต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ขณะที่ปริมาณเอเอ็มดีเอซึ่งบ่งบอกถึงการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นต้นยาสูบปกติที่มีปริมาณเอเอ็มดีเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

5.4.2 ผลของชนิดแสงที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาและการสะสมสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์ โดยวัดปริมาณสารในต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้แสงจากหลอดแบล็คไลท์และภายใต้แสงจากหลอดโกลลักซ์ ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เปรียบเทียบกับปริมาณสารในต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ พบว่าต้นยาสูบปกติที่เลี้ยงใต้หลอดแบล็คไลท์มีสารซัลฟูเรติน, กลุ่มเฟลโวนอล, กลุ่มเฟลโวนและเฟลวาโนน โดยปริมาณสารลูทีโอลินและ นาริจินินเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ส่วนต้นสายพันธุ์ *TT8* ได้หลอดแบล็คไลท์มีการผลิตสารซัลฟูเรติน, สารเฟลวาโนนและกลุ่มกลุ่มเฟลโวนอลเพิ่มขึ้น ต้นสายพันธุ์ *F3'H* มีปริมาณสารกลุ่มสารซัลฟูเรติน, กลุ่มเฟลโวนอล, กลุ่มเฟลโวน, กลุ่มเฟลวาโนนและแอนโทไซยานินบางตัว (เดลฟินิดิน)เพิ่มขึ้น ขณะที่ต้นสายพันธุ์ *PAP2* มีการสะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินลดลง ส่วนต้นสายพันธุ์ *CHS* มีสารซัลฟูเรติน, สารกลุ่มเฟลโวล, เฟลโวนอล, เฟลวาโนนและกลุ่มแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น ขณะที่ต้นยาสูบทดลองที่เพาะเลี้ยงใต้หลอดโกลลักซ์ทุกสายพันธุ์มีปริมาณสารทุกกลุ่มเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสงทั้ง 3 ชนิดของต้นยาสูบทุกสายพันธุ์มีปริมาณลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงทั้งในแสงแบล็คไลท์และแสงโกลลักซ์ โดยที่แสงแบล็ค-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลท์มีผลต่อการลดลงของคลอโรฟิลล์มากกว่าในแสงจากหลอดโกลด์ลักซ์ ขณะเอมดีเอมีปริมาณลดลงเช่นกัน โดยที่แสงจากหลอดโกลด์ลักซ์ทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันน้อยที่สุด

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าเฟลโวนอยด์ในกลุ่มต่างๆ ที่เพิ่มขึ้นน่าจะมีผลต่อการตอบสนองต่อแสงโดยช่วยในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนได้ ทำให้พืชต้านทานต่อสภาวะแสงต่างๆ ได้ และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในพืชสังเคราะห์เฟลโวนอยด์สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนในพืชสังเคราะห์นี้ได้ โดยปริมาณการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมมีแนวโน้มสูงกว่าในต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร สมพรไพสิน. 2547. บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กนกพร สมพรไพสิน. 2548. บทปฏิบัติการวิชาเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กนกพร สมพรไพสิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10(1) : 23-27.

นิรนาม. 2550ก. Compounds with a Mixed Biogenesis. [Online].Available :

<http://mylesson.swu.ac.th/ppg301/meta/12Mixed.htm>

ศักดิ์นัย สืบเสน. 2550.การโคลนยีน. [Online].Available :

<http://www.kr.ac.th/ebook2/sakdanai/04.html>

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. ศรีวิทยาพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ :

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หัทธยา กาวีวงศ์. 2548. อนุพันธุศาสตร์. เชียงใหม่ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Amanda, R. Walker. Paul, A. Davison. Agnese, C. Bolognesi-Winfield. Celia, M. James. N., Srinivasan. Tom, L. Blundell. Jeffrey, J. Esch. M., David Marks. and John, C. Gray. 1999. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis, Encodes a WD40 Repeat Protein. *Plant Cell* , 11, 1337-1350

Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L. 2004. *TT2*, *TT8*, and *TTG1* synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39 : 366-380.

Edward, L. Braun and Erich, Grotewold. 1999. Newly Discovered Plant c-myb-Like Genes Rewrite the Evolution of the Plant myb Gene Family. *Plant Physiology*, 121, 21-24

Eleonora, Cominelli. Giuliana, Gusmaroli. Domenico, Allegra. Massimo, Galbiati. Helena, K.

Wade. Gareth, I. Jenkins and Chiara Tonellia. 2007. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*.

[Online].Available : www.sciencedirect.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fabiana, Antognoni. Suiping, Zheng. Cristina, Pagnucco. Rita, Baraldi. Ferruccio, Poli and Stefania, Biondi. 2007. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. [Online]. Available : www.sciencedirect.com
- Fong, H.K. Hurley, J.B. Hopkins, R.S. Miake-Lye, R. Johnson, M.S. Doolittle, R.F and Simon, M.I. 1986. Repetitive segmental structure of the transducin β -subunit: homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83** , 2162–2166.
- Marc, A. Heim¹. Marc, Jakoby¹. Martin, Werber¹. Cathie, Martin. Bernd, Weisshaar and Paul, C. Bailey. 2003. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *MBE Advance Access*
- Nathalie, Nesi. Isabelle, Debeaujon. Clarisse, Jond. Georges, Pelletier. Michel, Caboche and Loïc, Lepiniec. 2001. The *TT8* Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of *DFR* and *BAN* Genes in *Arabidopsis* Siliques. *The Plant Cell*, **12**, 1863–1878
- Nathalie, Nesi. Clarisse, Jond. Isabelle, Debeaujon. Michel, Caboche and Loïc, Lepiniec. 2001. The *Arabidopsis TT2* Gene Encodes an R2R3 MYB Domain Protein That Acts as a Key Determinant for Proanthocyanidin Accumulation in Developing Seed. *The Plant Cell*, **13**, 2099–2114
- Yamazaki, M., Makita, Y., Springob, K. and Saito K. 2002. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochemical Engineering*. **14** : 191–197
- www.agi.nu.ac.th/newweb/reading/gene.pdf

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.2 (หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น 15 กรัม/ลิตร)		

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	0.2	กรัม/ลิตร
NaCl	0.0585	กรัม/ลิตร
KCl	0.0186	กรัม/ลิตร
MgCl ₂	10	มิลลิโมลาร์
MgSO ₄	10	มิลลิโมลาร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคสเข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

4. อาหารสูตร MS

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (มิลลิกรัม)ต่อลิตร
stock 1	NH_4NO_3	100x	165
	KNO_3		192
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		37
	KH_2PO_4		17
stock 2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100x	44
stock 3	H_3BO_3	1000x	3.1
	KI		0.415
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.125
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.0125
stock 4	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100x	2.23
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.86
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.0025
stock 5	Na_2EDTA	100x	3.73
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		2.78
stock 6	Inositol	100x	5
	Nicotinic acid		0.025
	Pyridoxin HCl		0.025
	Thiamine HCl		0.005
	Glycine		0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหารสูตรชักนำแคลลัส

อาหารสูตร MS เต็ม	Adenine	40	มิลลิกรัม/ลิตร
	MES	0.5	กรัม/ลิตร
	Sucrose	20	กรัม/ลิตร
	BAP	1.0	มิลลิกรัม/ลิตร
	IAA	0.1	มิลลิกรัม/ลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (Amersham Biosciences Crop.)

- 1.1 ทำอะกาโรสเจลอิลีค โทโรโพริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ตัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอด eppendorf
- 1.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตร ต่อเจล หนัก 10 มิลลิกรัม
- 1.3 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
- 1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ขงเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
- 1.5 ย้ายของเหลวในหลอด eppendorf ไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.6 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
- 1.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.9 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอด eppendorf ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอด eppendorf

2. การทำคอมพลีแทนท์เซลล์ (กนกพร, 2547)

- 2.1 ถ่ายเชื้อ *Escherichia coli* 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหาร LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาตรเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร บ่มที่ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.4-0.5

- 2.3 นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.4 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- 2.5 วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- 2.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันพอดี
- 2.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอด eppendorf หลอดละ 200 ไมโครลิตร
- 2.9 เก็บเซลล์ที่ -70 องศาเซลเซียส

3. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน

- 3.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์
 - 3.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง
 - 3.1.2 ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากัน โดยการปิเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
 - 3.1.3 นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 - 3.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.2 การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับเวกเตอร์ pBI121 ที่มีซันดีเอ็นเอแทรกอยู่
 - 3.2.1 เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน สเปรดเซลล์แขวนลอยที่เหลือนบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การสกัดพลาสมิด

- 4.1 ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 4.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ ใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์
- 4.3 เทส่วนอาหารทิ้ง เติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง
- 4.4 เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.5 เติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.6 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.7 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอด eppendorf ใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่เย็นจัดเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 4.8 นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที
- 4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิตร
- 4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.12 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือใช้เดซิเคเตอร์
- 4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี RNase เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร
- 4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเชื้อและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียโดยวิธี freeze-thaw (กนกพร, 2547)

- 5.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 5.2 นำสารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาวางบนน้ำแข็ง 10 นาที
- 5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 5.4 เทส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง
- 5.5 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ใหม่และผสมเวคเตอร์ที่มียีนที่สนใจประมาณ 2 ไมโครกรัม โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง
- 5.6 นำสารละลายนี้แช่ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็งแล้วนำมาบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง
- 5.7 นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 5.8 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร LB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- 5.9 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน

6. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (กนกพร, 2547)

- 6.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน นานข้ามคืน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที
- 6.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.8
- 6.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 6.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์กับ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์
- 6.5 นำใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสและจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 6.4 เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 6.6 นำชิ้นส่วนของพีชดังกล่าววางบนเพลต ที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก
- 6.7 วางชิ้นส่วนของพีชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่
- 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงอย่างต่อเนื่อง 3 วัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อประมาณ 3 วัน อะโกรแบคทีเรียจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พีช ตรงบริเวณรอยตัดของพีช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพีช
- 6.9 ย้ายชิ้นส่วนพีชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ ที่สามารถฆ่าอะโกรแบคทีเรียได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงอย่างต่อเนื่อง
- 6.10 ทำการย้ายชิ้นส่วนพีชบนอาหารใหม่ตามข้อ 6.9 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะได้รับยีน

7. การสกัดดีเอ็นเอจากพีช (กนกพร, 2548)

- 7.1 ใส่ใบไม้ 50-100 มิลลิกรัมในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร
- 7.2 ใช้แท่งแก้วบดละเอียดจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน
- 7.3 เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 300 ไมโครลิตร และสารละลายผสม phenol/chloroform/isoamylalcohol 450 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาและเขย่า 1 นาที
- 7.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 7.5 นำสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่าผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา
- 7.6 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 7.7 เทของเหลวทิ้ง ล้างส่วนตะกอนข้างล่างด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 500 ไมโครลิตร
- 7.8 ปั่นด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 7.9 เทของเหลวทิ้ง และทำให้แห้ง (คว่ำบนกระดาษซับที่สะอาด)
- 7.10 ละลายตะกอนใน TE ซึ่งมี RNase ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 50 ไมโครลิตร
- 7.11 นำสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร นำมาหยอดใน เจลอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดูปริมาณดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้